



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑧ EP 0 706 376 B1

⑩ DE 694 03 966 T 2

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A 61 K 9/16**  
A 61 K 9/70  
A 61 L 31/00  
A 61 K 31/20  
A 61 K 31/335  
A 61 K 38/57

DE 694 03 966 T 2

②	Deutsches Aktenzeichen:	694 03 966.7
⑧	PCT-Aktenzeichen:	PCT/CA94/00373
⑧	Europäisches Aktenzeichen:	94 920 360.8
⑧	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 95/03036
⑧	PCT-Anmeldetag:	19. 7. 94
⑧	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	2. 2. 95
⑧	Erstveröffentlichung durch das EPA:	17. 4. 96
⑧	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	25. 6. 97
④	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	5. 2. 98

③ Unionspriorität:

94536 19.07.93 US

⑦ Patentinhaber:

Angiotech Pharmaceuticals, Inc., Vancouver, British Columbia, CA; University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, CA

⑦ Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80801 München

⑧ Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

⑦ Erfinder:

BURT, Helen, M., Vancouver, British Columbia V5W 1L8, CA; HUNTER, William, L., Vancouver, British Columbia V5K 3L7, CA; MACHAN, Lindsay, S., Vancouver, British Columbia V6K 1A1, CA; ARSENAULT, A., Larry, Paris, Ontario N3L 3E1, CA; JACKSON, John, K., Vancouver, British Columbia V6N 2HN, CA

④ ANTI-ANGIOGENE MITTEL UND VERFAHREN ZU DEREN VERWENDUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 03 966 T 2

## Beschreibung

### Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Zusammensetzungen und Verfahren zum Behandeln von Krebs und anderen angiogenisch-abhängigen Erkrankungen, und genauer gesagt Zusammensetzungen, die anti-angiogene Faktoren umfassen, und polymere Träger, Endoprothesen, die mit derartigen Zusammensetzungen beschichtet worden sind, ebenso wie Verfahren zur Verwendung dieser Endoprothesen und Zusammensetzungen.

### Hintergrund der Erfindung

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in den Vereinigten Staaten und trägt zu über einem Fünftel der Gesamtmortalität bei. Kurz gesagt ist Krebs gekennzeichnet durch die unkontrollierte Teilung einer Population aus Zellen, die, am typischsten, zur Bildung von einem oder mehreren Tumoren führt. Obwohl Krebs allgemein leichter diagnostiziert wird als in der Vergangenheit, sind doch viele Formen, selbst wenn sie früh nachgewiesen werden, noch unheilbar.

Eine Vielzahl von Verfahren werden derzeit verwendet, um Krebs zu behandeln, einschließlich z.B. verschiedener chirurgischer Prozeduren. Wenn mittels der Chirurgie alleine behandelt, werden jedoch viele Patienten (besonders jene mit bestimmten Krebstypen, wie Brust-, Hirn-, Colon- und Leberkrebs) ein Wiederauftreten des Krebses erfahren. Zusätzlich zur Chirurgie wird Krebs oft auch mit einer Kombination von Therapien

behandelt, welche zytotoxische chemotherapeutische Wirkstoffe (z.B. Vincristin, Vinblastin, Cisplatin, Methotrexat, 5-FU, etc.) und/oder Strahlentherapie umfassen. Eine Schwierigkeit bei diesem Ansatz ist jedoch, daß strahlentherapeutische und chemotherapeutische Agenzien für normales Gewebe toxisch sind und oft lebensbedrohliche Nebenwirkungen bedingen. Zusätzlich zeigen diese Ansätze oft extrem hohe Raten hinsichtlich Scheitern und Remission.

Zusätzlich zu chirurgischen Therapien, Chemo- und Strahlentherapien haben andere versucht, das eigene Immunsystem eines Individuums zu nutzen, um Krebszellen zu eliminieren. Zum Beispiel haben manche die Verwendung von bakteriellen oder viralen Komponenten als Adjuvantien vorgeschlagen, um das Immunsystem zu stimulieren, Tumorzellen zu zerstören. (Siehe allgemein "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (Hrg.), Raven Press, New York, 1987.) Derartige Agenzien sind im allgemeinen als Adjuvantien und als nicht spezifische Stimulantien in tierischen Tumormodellen hilfreich, haben aber noch nicht gezeigt, daß sie allgemein bei Menschen wirksam sind.

Lymphokine sind auch in der Behandlung von Krebs verwendet worden. Kurz gesagt werden Lymphokine von einer Vielzahl von Zellen sekretiert und weisen allgemein eine Wirkung auf spezifische Zellen bei der Erzeugung einer Immunantwort auf. Beispiele von Lymphokinen schließen Interleukine (IL)-1, -2, -3 und -4 ebenso ein wie Kolonie-stimulierende Faktoren wie G-CSF, GM-CSF und M-CSF. Kürzlich hat eine Gruppe IL-2 verwendet, um periphere Blutzellen zu stimulieren, um zu expandieren und große Mengen an Zellen zu produzieren, die für Tumorzellen zytotoxisch sind (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 313:1485-1492, 1985).

Andere haben die Verwendung von Antikörpern bei der Behandlung von Krebs vorgeschlagen, Kurz gesagt können Antikörper ent-

wickelt werden, die bestimmte Zelloberflächenantigene erkennen, die entweder einzigartig oder auf Krebszellen vorherrschender sind verglichen mit normalen Zellen. Diese Antikörper, oder "Wunderkugeln", können entweder alleine oder konjugiert mit einem Toxin verwendet werden, um spezifisch Tumorzellen zu targetieren und zu töten. (Dillmann, "Antibody Therapy", Principles of Cancer Biotherapy, Oldham (Hrg.), Raven Press, Ltd., New York, 1987.) Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, daß die meisten monoklonalen Antikörper einen Ursprung in der Maus haben und somit Hypersensitivität gegen den Mausantikörper seine Wirksamkeit beschränken kann, besonders nach wiederholten Therapien. Verbreitete Nebeneffekte schließen ein Fieber, Schwitzen, Schüttelfrost, Hautausschläge, Arthritis und Nervenlähmungen.

Eine zusätzliche Schwierigkeit gegenwärtiger Verfahren besteht darin, daß lokales Wiederauftreten und lokale Krankheitskontrolle eine Hauptherausforderung bei der Behandlung von Malignität darstellt. Insbesondere haben insgesamt 630.000 Patienten jährlich (in den Vereinigten Staaten) lokalisierte Erkrankung (kein Beweis entfernter metastatischer Verbreitung) zum Zeitpunkt der Vorstellung; dies stellt 64 % aller Patienten dar, bei denen Malignität diagnostiziert wird (dies schließt nicht Nicht-Melanomhautkrebs oder in situ-Karzinome ein). Für die überwiegende Mehrheit dieser Patienten stellt die chirurgische Resektion der Krankheit die größte Chance für eine Heilung dar und tatsächlich werden 428.000 nach der anfänglichen Behandlung kuriert sein - 428.000. Unglücklicherweise werden 202.000 (oder 32 % aller Patienten mit lokalisierter Erkrankung) nach der anfänglichen Behandlung rezidivieren. Von denen, die rezidivieren beläuft sich die Anzahl derer, die aufgrund des lokalen Wiederauftretens der Erkrankung rezidivieren werden, auf 133.000 Patienten (oder 21 % all jener mit lokalisierter Erkrankung). Die Anzahl derer, die aufgrund entfernter Metastasen an der Erkrankung rezidivieren werden,



beträgt 68.000 Patienten jährlich (11 % aller Patienten mit einer lokalisierten Erkrankung). Weitere 102.139 Patienten werden jährlich als direkte Folge der Unfähigkeit sterben, das lokale Wachstum der Krankheit zu kontrollieren.

Nirgendwo ist das Problem offensichtlicher als bei Brustkrebs, der jährlich 186.000 Frauen in den Vereinigten Staaten betrifft und deren Mortalitätsrate seit 50 Jahren unverändert geblieben ist. Chirurgische Resektion der Erkrankung durch radikale Mastektomie, modifizierte radikale Mastektomie oder Lumpektomie bleibt die Hauptstütze der Behandlung für diesen Zustand. Unglücklicherweise werden 35 % derjenigen, die mit Lumpektomie alleine behandelt wurden, ein lokales Wiederauftreten der Erkrankung entwickeln und erstaunlicherweise werden dies auch 25 % derjenigen tun, bei denen man feststellte, daß der Resektionsrand histologisch frei von Tumor war. So viel wie 90 % dieser lokalen Wiederauftretungen werden innerhalb von 2 cm der vorherigen Exzisionsstelle auftreten.

In ähnlicher Weise wurde 1991 über 113.000 Tote und 238.600 neue Fälle von Lebermetastasen für Nordamerika alleine berichtet. Die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit Lebermetastasen beträgt nur 6,6 Monate, nachdem sich einmal Leberläsionen entwickelt haben. Nicht-chirurgische Behandlung für Lebermetastasen schließen systemische Chemotherapie, Bestrahlung, Chemoembolisierung, hepatische arterielle Chemotherapie und intraarterielle Bestrahlung ein. Trotz Beweises jedoch, daß derartige Behandlungen übergangsweise die Größe hepatischer Läsionen verringern können (z.B. verringern systemische Chemotherapie und hepatische arterielle Chemotherapie Läsionen anfangs bei 15 bis 20 %, bzw. 80 % der Patienten), treten die Läsionen unabänderlich wieder auf. Chirurgische Resektion von Lebermetastasen stellt die einzige Möglichkeit für eine Heilung dar, aber solch eine Prozedur ist nur bei 5 % der Patienten mit Metastasen möglich und nur bei 15 bis 20 % der Patienten

ten mit primärem Leberkrebs.

Ein Verfahren, das für die Behandlung von Tumoren mit beschränktem Erfolg versucht worden ist, ist die therapeutische Embolisierung. Kurz gesagt werden Blutgefäße, die einen Tumor versorgen vorsätzlich durch Injektion eines embolischen Materials in die Gefäße blockiert. Eine Vielzahl von Materialien ist in dieser Hinsicht ausprobiert worden, einschließlich autologer Substanzen wie Fett, Blutgerinsel und gehackte Muskelfragmente, ebenso wie künstliche Materialien, wie Wolle, Baumwolle, Stahlkugeln, Kunststoff- oder Glaskügelchen, Tantalpulver, Silikonverbindungen, radioaktive Partikel, steriler absorbierbarer Gelatineschwamm (Steripson, Gelfoam), oxidierte Cellulose (Oxycel), Stahlknäuel, Alkohol, lyophilisierte menschliche dura mater (Lyodura), mikrofibrilläres Collagen (Avitene), Collagenfibrillen (Tachotop), Polyvinylalkoholschwamm (PVA; Ivalon), Barium-imprägnierte Siliziumkugeln (Biss) und ablösbare Ballone. Die Größe von Lebermetastasen kann zeitweilig unter Verwendung derartiger Verfahren verringert werden, aber die Tumoren reagieren typischerweise, indem sie Wachstum neuer Blutgefäße in den Tumor verursachen.

Ein verwandtes Problem zur Tumorbildung ist die Entwicklung von Krebsblockaden, die den Strom von Material durch Körperdurchgänge verhindern, wie den Gallengängen, der Trachea, den Ösophagus, die Blutgefäßverteilung und den Harnleiter. Eine Vorrichtung, die Endoprothese, ist entwickelt worden, um Durchgänge offen zu halten, die durch Tumore oder andere Substanzen blockiert worden sind. Typische Beispiele herkömmlicher Endoprothesen schließen den Wallstent, die Strecker-Endoprothese, die Gianturco-Endoprothese und die Palmaz-Endoprothese ein. Das Hauptproblem mit Endoprothesen ist jedoch, daß sie nicht das Einwachsen von Tumor oder entzündlichem Material durch die Zwischenräume der Endoprothese verhindern. Wenn dieses Material die Innenseite einer Endoprothese erreicht und

das Lumen der Endoprothese umfaßt, kann es zur Blockade des Körperdurchgangs führen, in den sie eingesetzt worden ist. Zusätzlich kann die Gegenwart einer Endoprothese im Körper reaktives oder entzündliches Gewebe (z.B. Blutgefäße, Fibroplasten, weiße Blutzellen) induzieren, in das Lumen der Endoprothese einzuwandern, was zum teilweisen oder vollständigen Verschluß der Endoprothese führt.

EP-A-0 470 569 offenbart ein intravaskuläres aufnehmendes Agens, welches einen anti-angiogenen Faktor in einem Polymerträger umfaßt. WO-A-9111193 offenbart ein Implantat, welches ein anti-angiogenes Agens zur kontrollierten Freisetzung des Agens umfaßt. WO-A-9212717 offenbart ein Medikament, welches ein Tetracyclin als ein anti-angiogenes Agens umfaßt, das mit einem chemotherapeutischen Agens, wie Taxol, verwendet werden kann.

Die vorliegende Erfindung sieht Zusammensetzungen und Verfahren vor, die geeignet sind für die Behandlung von Krebs und anderen Angiogenese-abhängigen Erkrankungen, die sich den Problemen zuwenden, die mit den oben diskutierten Prozeduren verbunden sind, und sieht weitere andere in Zusammenhang stehende Vorteile vor.

#### Zusammenfassung der Erfindung

Kurz gesagt betrifft die vorliegende Erfindung anti-angiogene Zusammensetzungen, ebenso wie Verfahren und Vorrichtungen, die derartige Zusammensetzungen für die Behandlung von Krebs und anderen Angiogenese-abhängigen Erkrankungen verwenden. Zusammensetzungen werden offenbart (hierin im folgenden als "anti-angiogene Zusammensetzung" bezeichnet), die (a) einen anti-angiogenen Faktor und (b) einen Polymerträger umfassen. Eine große Vielzahl von Molekülen können innerhalb des Schutzzumfanges der vorliegenden Erfindung als anti-angiogene Faktoren

verwendet werden, einschließlich z.B. Anti-invasiver Faktor, Retinol-Säure und ihre Derivate, Taxol, Taxol-Analoga und Taxol-Derivate, und Mitglieder der Gruppe, die Suramin, Gewebeinhibitor von Metalloproteinase-1, Gewebeinhibitor von Metalloproteinase-2, Plasmin-Aktivator-Inhibitor-1 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 umfassen. In ähnlicher Weise können eine Anzahl von Polymerträgern verwendet werden, für die typische Beispiele Poly(Ethylen-Vinylacetat), quervernetzt mit 40 % Vinylacetat, Poly(Milch-co-Glykol-Säure), Polycaprolacton, Polymilchsäure, Copolymere aus Poly(Ethylen-Vinylacetat), quervernetzt mit 40 % Vinylacetat und Polymilchsäure, und Copolymere von Polymilchsäure und Polycaprolacton umfassen. Innerhalb einer Ausführungsform weist die Zusammensetzung eine Durchschnittsgröße von 15 bis 200  $\mu\text{m}$  auf.

Es werden Verfahren zum Embolisieren eines Blutgefäßes offenbart, welche den Schritt umfassen, in das Gefäß eine therapeutisch wirksame Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung verabreichen (wie oben beschrieben), so daß das Blutgefäß wirksam okkludiert wird. In einer Ausführungsform wird die anti-angiogene Zusammensetzung an einem Blutgefäß freigesetzt, das einen Tumor versorgt.

In einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Endoprothesen vorgesehen, die eine allgemein röhrenförmige Struktur aufweisen, deren Oberfläche mit einem oder mehreren anti-angiogenen Zusammensetzungen beschichtet ist. In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung sind derartige Endoprothesen vorgesehen zur Verwendung in einem Verfahren zum Erweitern des Lumens eines Körperdurchgangs, das Einführen einer Endoprothese in den Durchgang umfaßt, wobei die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur beschichtet ist mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung wie oben beschrieben, so daß der Durchgang erweitert wird. In verschiedenen Ausführungsformen der

Erfindung schließen derartige Verfahren ein, Gallengangobstruktionen zu eliminieren und umfassen Inserieren einer Gallengangendoprothese in einen Gallengangdurchgang: Eliminieren von Harnröhrenobstruktionen, welches umfaßt, Inserieren einer Harnröhrenendoprothese in eine Harnröhre, Eliminieren ösophagaler Obstruktionen, welches umfaßt, Inserieren einer ösophagalen Endoprothese in einen Ösophagus und Eliminieren trachealer/bronchialer Obstruktionen, welches umfaßt, Inserieren einer trachealen/bronchialen Endoprothese in die Trachea oder die Bronchien. In jeder dieser Ausführungsformen weist die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur auf, ist die Oberfläche mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben.

Verfahren werden offenbart zur Behandlung von Tumorexzisionsstellen, welche umfassen, Verabreichen einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, an die Resektionsränder eines Tumors nach der Exzision, so daß das örtliche Wiederauftreten von Krebs und die Bildung neuer Blutgefäße an der Stelle inhibiert wird. Verfahren zum Behandeln cornealer Neovaskularisierung werden offenbart, die den Schritt umfassen, eine therapeutisch wirksame Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, der Cornea zu verabreichen, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird. In einer Ausführungsform umfaßt die anti-angiogene Zusammensetzung weiterhin ein topisches Corticosteroid.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Zusammensetzung zur Verfügung gestellt für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Arthritis, wobei die Zusammensetzung ein anti-angiogenes Agens umfaßt. Ein Verfahren zur Angiogenese-Inhibierung wird offenbart, welches umfaßt, Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die Taxol umfaßt, an einen Patienten mit einer nicht-tumorigenen, Angiogenese-abhängigen Erkrankung, so daß

die Bildung von neuen Blutgefäßen inhibiert wird. In einem anderen Aspekt werden Verfahren zum Embolisieren von Blutgefäßen in nicht-tumorigenen, nicht-Angiogenese-abhängigen Erkrankungen offenbart, umfassend Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die Taxol umfaßt, an ein Gefäß, so daß das Blutgefäß wirksam okkludiert wird.

Verfahren werden offenbart zum Erweitern des Lumens eines Körperdurchgangs, welches umfaßt, Inserieren einer Endoprothese in den Durchgang, wobei die Endoprothese eine im allgemeinen röhrenförmige Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur mit einer Zusammensetzung beschichtet ist, die Taxol umfaßt, so daß der Durchgang erweitert wird. Verfahren werden vorgesehen zum Eliminieren von Gallenobstruktionen, umfassend Inserieren einer Gallengangendoprothese in einen Gallengang; zum Eliminieren urethraler Obstruktionen, umfassend Inserieren einer Harnröhrendoprothese in eine Harnröhre; zum Eliminieren Ösophagaler Obstruktionen, umfassend Inserieren einer Ösophagusendoprothese in einen Ösophagus; und Eliminieren trachealer/bronchialer Obstruktionen, umfassend Inserieren einer Trachial-/Bronchialendoprothese in die Trachea oder die Bronchien. In einer jeder dieser Ausführungsformen weist die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur auf, wobei die Oberfläche der Struktur beschichtet ist mit einer Zusammensetzung, die Taxol umfaßt.

Verfahren werden vorgesehen zum Behandeln einer Tumorexzisionsstelle, welches umfaßt, Verabreichen einer Zusammensetzung, die Taxol umfaßt, an den Resektionsrand eines Tumors nach Exzision, so daß das lokale Wiederauftreten von Krebs und die Bildung neuer Blutgefäße an der Stelle inhibiert wird. Verfahren werden vorgesehen zum Behandeln cornealer Neovaskularisierung, welche umfassen, Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer Zusammensetzung, die Taxol umfaßt, der Cornea, so daß die Bildung neuer Gefäße inhibiert wird.

Pharmazeutische Produkte werden vorgesehen, die (a) Taxol, in einem Behältnis, und (b) eine Notiz umfassen, die dem Behältnis in der durch eine Regierungsbehörde, die die Herstellung, Verwendung oder Verkauf von Pharmazeutika regelt, vorgeschriebenen Form beigefügt ist, wobei die Notiz Zustimmung durch die Behörde für das Taxol wiedergibt für menschliche oder veterinärmedizinische Verabreichung, um nicht-tumorgene Angiogenese-abhängige Erkrankungen zu verabreichen. Kurz gesagt macht es das Bundesgesetz erforderlich, daß die Verwendung eines pharmazeutischen Agens in der Therapie von Menschen durch eine Behörde der Bundesregierung gebilligt wird. Verantwortlichkeit für die Durchsetzung (in den Vereinigten Staaten) liegt bei der Food and Drug Administration, die geeignete Regularien herausgibt, um derartige Zustimmung sicherzustellen, ausgeführt in 21 U.S.C. §§ 301-392. Regulierung für biologische Materialien, die Produkte umfassen, die aus tierischem Gewebe hergestellt sind, wird ebenfalls unter 42 U.S.C. § 262 kodifiziert. Ähnlicher Zustimmung bedarf es in den meisten Ländern, obwohl die Regularien von Land zu Land schwanken können.

Die vorliegende Erfindung sieht die Verwendung von Taxol zur Herstellung eines Medikaments für Angiogenese vor.

Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden durch Bezugnahme auf die folgende detaillierte Beschreibung und beigefügten Zeichnungen offensichtlich werden. Außerdem werden verschiedene Literaturstellen unten angeführt werden, die detaillierter bestimmte Prozeduren oder Zusammensetzungen beschreiben und die hierin in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme aufgenommen werden.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1A ist eine Fotografie, die schalenlose Eierkultur am Tag 6 zeigt. Fig. 1B ist ein digitalisiertes computerdargestelltes Bild, das mit einem Stereomikroskop aufgenommen wurde, von lebenden, ungefärbten Kapillaren (1040x). Fig. 1C ist ein Gewebeerstörungsguß, der die CAM-Mikrovaskulatur zeigt, die durch größere, darunterliegende Gefäße ernährt wird (Pfeile; 1300x). Fig. 1D stellt einen 0,5 mm dicken Kunststoffschnitt dar, der transversal durch die CAM geschnitten ist, und auf Lichtmikroskopebene aufgezeichnet wurde. Diese Fotografie zeigt die Zusammensetzungen der CAM, einschließlich eines äußeren doppel-schichtigen Ectoderms (Ec), eines Mesoderms (M), das Kapillaren (Pfeile) und verteilte Adventitia-Zellen enthält, und ein einschichtiges Endoderm (En) (400x). Fig. 1E ist eine Fotografie auf Elektronenmikroskopniveau (3500x), wobei typische Kapillarstruktur gezeigt ist, die dünnwandige Endothelzellen zeigt (Pfeilspitzen) und eine assoziierte Pericyte.

Fig. 2A, 2B, 2C und 2D sind eine Serie von digitalisierten Bildern von vier verschiedenen, ungefärbten CAMs, die nach 48 stündiger Taxolexposition aufgenommen wurden.

Fig. 3A, 3B und 3C sind eine Serie von Fotografien von 0,5 mm dicken Plastikschnitten, die transversal durch ein Taxol-behandeltes CAM an drei verschiedenen Stellen innerhalb der avaskulären Zone geschnitten wurden.

Fig. 4A, 4B und 4C sind eine Serie von Elektronenmikrografien, die von Stellen aufgenommen wurden, ähnlich denen der obigen Fig. 3A, 3B bzw. 3C.

Fig. 5 ist ein Balkendiagramm, das die Größenverteilung von Mikrosphären nach der Zahl darstellt (5 % ELVAX mit 10 mg Natriumsuramin in 5 % PVA).

Fig. 6 ist ein Balkendiagramm, das die Größenverteilung von



Mikrosphären nach dem Gewicht darstellt (5 % ELVAX mit 10 mg Natriumsuramin in 5 % PVA).

Fig. 7 ist ein Liniendiagramm, das das Einkapselgewicht von Natriumsuramin in 1 ml 5 % ELVAX darstellt.

Fig. 8 ist ein Liniendiagramm, das den Enkapsulierungsprozent-satz von Natriumsuramin in ELVAX darstellt.

Fig. 9 ist ein Balkendiagramm, das die Größenverteilung von 5 % ELVAX Mikrosphären, die 10 mg Natriumsuramin enthalten, hergestellt in 5 % PVA, das 10 % NaCl enthält, darstellt.

Fig. 10 ist ein Balkendiagramm, das die Größenverteilung nach Gewicht von 5 % PLL Mikrosphären, die 10 mg Natriumsuramin enthalten, hergestellt in 5 % PVA, das 10 % NaCl enthält.

Fig. 11 ist ein Balkendiagramm, das die Größenverteilung nach Anzahl von 5 % PLL Mikrosphären darstellt, die 10 mg Natriumsuramin enthalten, hergestellt in 5 % PVA, enthaltend 10 % NaCl.

Fig. 12 ist ein Liniendiagramm, das den Verlauf der Freisetzung von Natriumsuramin darstellt.

Fig. 13 ist eine Darstellung einer typischen Ausführungsform von Embolisierung eines hepatischen Tumors.

Fig. 14 ist eine Darstellung der Inserierung einer typischen Endoprothese, die mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung beschichtet ist.

Fig. 15A ist ein Diagramm, das die Wirkung von EVA:PLA-Polymermischverhältnis auf Aggregation von Mikrosphären darstellt.  
Fig. 15B ist ein Rasterelektronenmikrofotographie, das die

Größe von "kleinen" Mikrosphären zeigt. Fig. 15C ist eine Rasterelektronenmikrophotographie, die die Größe von "großen" Mikrosphären zeigt. Fig. 15D ist ein Diagramm, das den Zeitverlauf von in vitro Taxol-Freisetzung aus 0,6 % w/v Taxol-beladenen 50:50 EVA:PLA-Polymermischungsmikrosphären in Phosphat-gepufferte Saline (pH 7,4) bei 37°C darstellt. Offene Kreise sind "klein" dimensionierte Mikrosphären, und große Kreise sind "groß" dimensionierte Mikrosphären. Fig. 15E ist eine Fotografie eines CAM, die das Ergebnis von Taxol-Freisetzung von Mikrosphären ("MS") zeigt. Fig. 15F ist eine Fotografie ähnlich der von Fig. 15E bei stärkerer Vergrößerung.

Fig. 16 ist ein Diagramm, das die Freisetzungsratenprofile von Polycaprolactonmikrosphären zeigt, die 1 %, 2 %, 5 % oder 10 % Taxol enthalten, in Phosphat-gepufferte Saline bei 37°C. Fig. 16B ist eine Fotografie, die ein mit Kontrollmikrosphären behandeltes CAM zeigt. Fig. 16C ist eine Fotografie, die ein CAM zeigt, das mit 5 % Taxol-beladenen Mikrosphären behandelt wurde.

Fig. 17A bzw. 17B sind zwei Diagramme, die die Freisetzung von Taxol aus EVA-Filmen zeigt und den Prozentsatz Taxol, der in jenen Filmen über die Zeit zurückbleibt. Fig. 17C ist ein Diagramm, das das Schwellen von EVA/F127-Filmen mit ohne Taxol über die Zeit zeigt. Fig. 17D ist ein Diagramm, das das Schwellen EVA/Span 80 Filmen mit ohne Taxol über die Zeit zeigt. Fig. 17E ist ein Diagramm, das eine Kurve Streß gegen Zug (?) für verschiedene EVA/F127-Mischungen zeigt.

Fig. 18A und 18B sind zwei Diagramme, die den Schmelzpunkt von PCL/MePEG-Polymermischungen als eine Funktion von % MePEG in der Formulierung (18A) zeigen und den prozentmäßigen Zeitzuwachs, der von PCL-Paste bei 60°C benötigt wird, um zu beginnen, zu verfestigen, als eine Funktion der Menge von MePEG in der Formulierung (18B). Fig. 18C ist ein Diagramm, das die

Brüchigkeit von verschiedenen PCL/MePEG-Polytermischungen dargestellt. Fig. 18D ist ein Diagramm, das den Prozentsatz Gewichtsänderung über die Zeit für Polymermischungen verschiedener MePEG-Konzentrationen darstellt. Fig. 18E ist ein Diagramm, das die Rate von Taxol-Freisetzung über die Zeit von verschiedenen Polymermischungen, die mit 1 % Taxol beladen sind, darstellt. Fig. 18F und 18G sind Graphen, die den Effekt verschiedener Mengen Taxol auf die Gesamtmenge von freigesetztem Taxol von 20 % MePEG/PCL-Mischung darstellen. Fig. 18H ist ein Diagramm, das die Wirkung von MePEG auf die Zugfestigkeit von MePEG/PCL-Polymer darstellt.

Fig. 19A ist eine Fotografie, die Kontrollthermopaste (unbeschichtet) auf CAM zeigt. Fig. 19B ist eine Fotografie von 20 % Taxol-beladener Thermopaste auf einem CAM.

Fig. 20A und 20B sind zwei Fotografien eines CAM mit einem Tumor, der mit Kontrollthermopaste (unbeschichtet) behandelt wurde. Fig. 20C und 20D sind zwei Fotografien von einem CAM mit einem Tumor, der mit Taxol-beladener Thermopaste behandelt wurde.

Fig. 21A ist ein Diagramm, das die Wirkung von Taxol/PCL auf Tumorstachstum zeigt. Fig. 21B und 21C sind zwei Fotografien, die die Wirkung von Kontrolle, 10 % und 20 % Taxol-beladener Thermopaste auf Tumorstachstum zeigen.

Fig. 22A ist eine Fotografie von Synovium von PBS-injiziertem Gelenk. Fig. 22B ist eine Fotografie von Synovium von einem Mikrosphären-injizierten Gelenk. Fig. 22C ist eine Fotografie von einem Knorpel aus Gelenken, in die PBS injiziert wurde, und Fig. 22D ist eine Fotografie eines Knorpels aus Gelenken, in die Mikrosphären injiziert wurden.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Wie oben festgehalten, sieht die vorliegende Erfindung Verfahren und Zusammensetzungen vor, die anti-angiogene Faktoren nutzen. Kurz gesagt sollten im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung anti-angiogene Faktoren so verstanden werden, daß sie irgendein Protein, Peptid, chemisches oder anderes Molekül umfassen, die so wirken, daß sie vaskuläres Wachstum inhibieren. Eine Vielzahl von Verfahren kann leicht verwendet werden, um die anti-angiogene Aktivität eines gegebenen Faktors zu bestimmen, einschließlich z.B., Hühnchen-Chorioallantois-Membran ("CAM")-Tests. Kurz gesagt, wie detaillierter beschrieben in Beispielen 2A und 2C, wird ein Teil der Schale von einem frisch befruchteten Hühnerei entfernt und eine Methylcellulosescheibe, die eine Probe des anti-angiogenen Faktors, der getestet werden soll, auf die Membran plaziert. Nach mehreren Tagen (z.B. 48 Stunden) kann die Inhibierung vaskulären Wachstums durch die zu testende Probe leicht bestimmt werden durch Visualisieren der Hühnchen-Chorioallantois-Membran in der Region, die die Methylcellulosescheibe umgibt. Inhibierung von vaskulärem Wachstum kann auch quantitativ bestimmt werden, z.B., durch Bestimmen der Anzahl und Größe von Blutgefäßen, die die Methylcellulosescheibe umgeben, verglichen mit einer Kontroll-Methylcellulose-Scheibe. Besonders bevorzugte anti-angiogene Faktoren, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, inhibieren die Bildung neuer Blutgefäße in dem oben beschriebenen Test vollständig.

Eine Vielzahl von Tests kann verwendet werden, um die Wirksamkeit anti-angiogener Faktoren in vivo zu bestimmen, einschließlich z.B. Mausmodelle, die zu diesem Zweck entwickelt worden sind (siehe Roberston et al., Cancer. Res. 51:1339-1344, 1991). Zusätzlich sind eine Vielzahl typischer in vivo Tests detaillierter unten in Beispielen 5 bis 7 und 17 bis 19 beschrieben worden, betreffend verschiedene Aspekte der hierin beschriebenen Erfindung.

Wie oben festgehalten, liefert die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die einen anti-angiogenen Faktor und einen Polymerträger umfassen. Kurz gesagt kann eine große Vielzahl von anti-angiogenen Faktoren leicht verwendet werden innerhalb des Rahmens der vorliegenden Erfindung. Typische Beispiele schließen Anti-invasiven Faktor, Retinol-Säure und Derivate davon, Taxol, und Mitglieder der Gruppe ein, die aus Suramin, Gewebeinhibitor von Metalloproteinase-1, Gewebeinhibitor von Metallproteinase-2, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 umfaßt. Diese und andere anti-angiogene Faktoren werden detaillierter unten beschrieben werden.

Kurz gesagt, ist bekannt, daß Anti-invasiver Faktor, oder "AIF", der aus Knochenextrakten hergestellt ist, Bestandteile enthält, die dafür verantwortlich sind, das Wachstum neuer Blutgefäße zu inhibieren. Diese Bestandteilen umfassen eine Familie von 7 niedermolekulargewichtigen Proteine (< 50.000 Dalton) (Kuettner und Pauli, "Inhibition of neovascularization by a cartilage factor" in *Development of the Vascular System*, Pitman Books (Ciba Foundation Symposium 100), S. 163-173, 1983), einschließlich einer Vielzahl von Proteinen, die inhibitorische Wirkungen gegen eine Vielzahl von Proteasen aufweisen (Eisenstein et al., *Am. J. Pathol.* 81:337-346, 1975; Langer et al., *Science* 193:70-72, 1976; und Horton et al., *Science* 199:1342-1345, 1978). AIF, der geeignet für die Verwendung innerhalb der vorliegenden Erfindung ist, kann leicht hergestellt werden unter Verwendung von in der Technik bekannten Techniken (z.B. Eisenstein et al., aaO.; Kuettner und Pauli, aaO.; und Langer et al., aaO.). Gereinigte Bestandteile von AIF, wie Knochen-abgeleiteter Inhibitor ("CDI") (siehe Moses et al., *Science* 248:1408-1410, 1990) können leicht hergestellt und verwendet werden innerhalb des Kontextes der vorliegenden Erfindung.

Retinolsäuren verändern den Metabolismus von Komponenten der extrazellulären Matrix, was zur Inhibierung der Angiogenese führt. Zusatz von Prolin-Analoga, angiostatischen Steroiden oder Heparin kann verwendet werden, um synergistisch die anti-angiogene Wirkung von Transretinolsäure zu erhöhen. Retinolsäure, ebenso wie Derivate davon, die auch verwendet werden können im Kontext der vorliegenden Erfindung, können leicht erhalten werden von kommerziellen Quellen, einschließlich z. B. Sigma Chemical Co. (#R2625).

Taxol ist ein hochderivatisiertes Diterpenoid (Wani et al., J. Am. Chem. Soc. 93:2325, 1971), das erhalten worden ist aus der geernteten und getrockneten Rinde von *Taxus brevifolia* (Pacific Yew.) und *Taxomyces Andreanae* und *Endophytic Fungus* der Pazifischen Eibe. (Stierle et al., Science 60:214-216, 1993). Allgemein wirkt Taxol dahin, mikrotubuläre Strukturen zu stabilisieren durch Bindung von Tubulin, um abnormale methodische Spindeln zu bilden. "Taxol", welches hierin so verstanden werden soll, daß es Analoge und Derivate von Taxol (wie z.B., Baccatin und Taxotere einschließt), kann leicht unter Verwendung von den Fachleuten bekannten Techniken hergestellt werden (siehe auch WO 94/07882, WO 94/07881, WO 94/07880, WO 94/07876, WO 93/23555, WO 93/10076, U.S. Patent Nr. 5,294,637; 5,283,253; 5,279,949; 5,274,137; 5,202,448; 5,200,534; 5,229,526 und EP 590 267) oder von einer Vielzahl von kommerziellen Quellen erhalten werden, einschließlich z.B. Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri (T7402 - von *Taxus brevifolia*).

Suramin ist eine polysulfonierte Naphthylharnstoff-Verbindung, die typischerweise als ein trypanocidales Agens verwendet wird. Kurz gesagt blockiert Suramin die spezifische Zelloberflächenbindung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor ("PDGF"), epidermaler Wachstumsfaktor ("EGF"), transformierender Wachstumsfaktor ("TGF- $\beta$ "),

Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor ("IGF-1") und Fibroblastenwachstumsfaktor ("βFGF"). Suramin kann gemäß den bekannten Techniken hergestellt werden, oder einfach von einer Vielzahl kommerzieller Quellen erhalten werden, einschließlich z.B. Mobay Chemical Co., New York (siehe Gagliardi et al., Cancer Res. 52:5073-5075, 1992; und Coffey, Jr., et al., J. of Cell Phys. 132:143-148, 1987).

Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen-1 ("TIMP") wird durch endotheliale Zellen sekretiert, die auch MTPasen sekretieren. TIMP ist glykosiliert und weist ein Molekulargewicht von 28,5 kD auf. TIMP-1 reguliert Angiogenese durch Binden an aktivierte Metalloproteinasen und supprimiert dabei die Invasion von Blutgefäßen in die extrazelluläre Matrix. Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen-2 ("TIMP-2") kann verwendet werden, um Angiogenese zu inhibieren. Kurz gesagt ist TIMP-2 ein 21 kD-nicht-glykosiliertes Protein, das an Metalloproteinasen sowohl in der aktiven als auch latenten Proenzym-Form bindet. Sowohl TIMP-1 als auch TIMP-2 können von kommerziellen Quellen wie Synergen, Boulder, Colorado, erhalten werden.

Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI) ist ein 50 kD-Glykoprotein, das in Blutplättchen vorhanden ist und kann durch Endothelzellen und Muskelzellen synthetisiert werden. PAI-1 inhibiert t-PA und Urokinase-Plasminogen-Aktivator an der basolateralen Stelle des Endotheliums und reguliert zusätzlich den Fibrinolyse-Prozeß. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-2 (PAI-2) wird allgemein im Blut unter bestimmten Bedingungen gefunden, wie während der Schwangerschaft und in Gegenwart von Tumoren. Kurz gesagt ist PAI-2 ein 56 kD Protein, das durch Monocyten und Makrophagen sekretiert wird. Man nimmt an, daß es die fibrinolytische Aktivität reguliert und im besonderen Urokinase-Plasminogen-Aktivator und Gewebe-Plasminogen-Aktivator inhibiert und dadurch Fibrinolyse verhindert.

Eine große Vielzahl von anderen anti-angiogenen Faktoren kann im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Typische Beispiele schließen Plättchenfaktor 4 (Sigma Chemical Co., #F1385); Protaminsulfat (Clupeine) (Sigma Chemical Co., #P4505); sulfatierte Chitin-Derivate (hergestellt von Königinnenkrabben-schalen), (Sigma Chemical Co., #C3641) Murata et al., Cancer Res. 51:22-26, 1991); sulphatierter Polysaccharid-Peptidoglykan-Komplex (SP-PG) (die Funktion dieser Verbindung kann verstärkt werden durch die Gegenwart von Steroiden, wie Estrogen und Tamoxifencitrat); Staurosporin (Sigma Chemical Co., #S4400); Modulatoren des Matrixmetabolismus, einschließlich z.B. Prolinanalogue {[ (L-Azetidin-2-Carbonsäure (LACA) (Sigma Chemical Co., #A0760)), Cishydroxyprolin, d,L-3,4-Dehydroprolin (Sigma Chemical Co., #D0265), Thiaprolin (Sigma Chemical Co., #T0631)],  $\alpha,\alpha$ -Dipyridyl (Sigma Chemical Co., #D7505),  $\beta$ -Aminopropionitrilfumarat (Sigma Chemical Co., #A3134)}}; MDL 27032 (4-Propyl-5-(4-Pyridinyl)-2(3H)-Oxazolone; Merion Merrel Dow Research Institute); Methotrexat (Sigma Chemical Co., #A6770; Hirata et al., Arthritis and Rheumatism 32:1065-1073, 1989); Mitoxantron (Polverini und Novak, Biochem. Biophys. Res. Comm. 140:901-907); Heparin (Folkman, Bio. Phar. 34:905-909, 1985; Sigma Chemical Co., #P8754); Interferone (z.B. Sigma Chemical Co., #13265); 2 Makroglobulinserum (Sigma Chemical Co., #M7151), ChIMP-3 (Pavloff et al., J. Bio. Chem. 267:17321-17326, 1992); Chymostatin (Sigma Chemical Co., #C7268; Tomkinson et al., Biochem J. 286:475-480, 1992);  $\beta$ -Cyclodextrin-Tetradecasulfat (Sigma Chemical Co., #C4767); Eponemycin; Estramustin (erhältlich von Sigma; Wang und Stearns Cancer Res. 48:6262-6271, 1988); Fumagillin (Sigma Chemical Co., #F6771; kanadisches Patent Nr. 2,024,306; Ingber et al. Nature 348:555-557, 1990); Gold-Natrium-Thiomalat ("GST"; Sigma: G4022; Matsubara und Ziff, J. Clin. Invest. 79:1440-1446, 1987); (D-Penicillamin ("CDPT"; Sigma Chemical Co., #P4875 oder P5000(HCl));  $\beta$ -1-Anticollagenase-Serum;  $\alpha$ 2-Antiplasmin (Sigma Chemical Co.:A0914; Holmes et al., J. Biol.



Chem 262(4):1659-1664, 1987); Bisantren (National Cancer Institute); Lobenzarit-Dinatrium-(N-(2)-carboxyphenyl-4-chloranthronilsäure-Dinatrium oder "CCA"; Takeuchi et al., Agents Actions 36:312-316, 1992); Thalidomid, angiostatisches Steroid, AGM-1470, Carboxyaminolmidazol, Metalloproteinase-Inhibitoren wie BB94 und das Peptid CDPGYIGSR-NH<sub>2</sub> (SEQUENZ ID NR. 1) (Iwaki Glass, Tokyo, Japan).

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können eine große Vielzahl von Verbindungen zusätzlich zu dem anti-angiogenen Faktor und Polymerträger umfassen. Zum Beispiel können anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung auch, in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung, ein oder mehrere Antibiotika, Anti-Inflammatorien, anti-virale Agenzien, anti-fungale Agenzien und/oder anti-protozoale Agenzien umfassen. Typische Beispiele von Antibiotika, die in den hierin beschriebenen Zusammensetzungen umfaßt sind, umfassen: Penicilline; Cephalosporine, wie Cefadroxil, Cefazolin, Cefaclor; Aminoglykoside, wie Gentamycin und Tobramycin; Sulfonamide, wie Sulfamethoxazol; und Metronidazol. Typische Beispiele von Anti-Inflammatorien schließen ein: Steroide wie Prednison, Prednisolon, Hydrocortison, adrenocorticotropes Hormon und Sulfasalazin; und nicht-steroidale anti-inflammatorische Wirkstoffe ("NSAIDS"), wie Aspirin, Ibuprofen, Naproxen, Fenopfen, Indomethacin und Phenylbutazon. Typische Beispiele antiviraler Agenzien schließen ein Acyclovir, Ganciclovir, Zidovudin. Typische Beispiele antifungaler Agenzien schließen ein: Nystatin, Ketoconazol, Griseofulvin, Flucytosin, Miconazol, Clotrimazol. Typische Beispiele antiprotozoaler Agenzien schließen ein: Pentamidin-Isethionat, Chinin, Chloroquin und Mefloquin.

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch ein oder mehrere Hormone umfassen, wie Thyroidhormone, Estrogen, Progesteron, Cortison und/oder Wachstumshormone.

ne, andere biologisch aktive Moleküle, wie Insulin, ebenso wie  $T_{H1}$ - (z.B. Interleukine -2, -12 und -15, Gamma-Interferon oder  $T_{H2}$ - (z.B. Interleukine -4 und -10) Zytokine.

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch umfassen zusätzliche Bestandteile wie oberflächenaktive Verbindungen (entweder hydrophil oder hydrophob, siehe Beispiel 13), anti-neoplastische oder chemotherapeutische Agenzien (z.B. 5-Fluoruracil, Vinblastin, Doxyrubicin, Adriamycin oder Tamocifen), radioaktive Agenzien (z.B. Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 und Bi-212) oder Toxine (z.B. Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Choleratoxin, Gelonin, antivirales Pokeweed-Protein, Tritin, Shigella-Toxin und Pseudomonas-Exotoxin A).

Wie oben festgehalten umfassen anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung einen anti-angiogenen Faktor und einen Polymerträger. Zusätzlich zu der großen Menge von anti-angiogenen Faktoren und anderen Verbindungen, wie oben diskutiert, können anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eine große Vielzahl von Polymerträgern umfassen, einschließlich z.B. sowohl biologisch abbaubare als auch nicht-biologisch abbaubare Zusammensetzungen. Typische Beispiele biologisch abbaubarer Zusammensetzungen schließen Albumin, Gelatine, Stärke, Cellulose, Dextrane, Polysaccharide, Fibrinogen, Poly(d,l-Lactid), Poly(d,l-Lactid-co-Glycolid), Poly(Glykolid), Poly(Hydroxybutyrat), Poly(Alkylcarbonate) und Poly(Orthoester) ein (siehe allgemein, Illum, L., Davis, S.S. (Hrsg.) "Polymers in controlled Drug Delivery" Wright, Bristol, 1987; Arshady, J. Controlled Release 17:1-22, 1991, Pitt, Int. J. Phar. 59:173-196, 1990, Holland et al., J. Controlled Release 4:155-0180, 1986). Typische Beispiele nicht-abbaubarer Polymere schließen EVA-Copolymere, Silikon-gummi und Poly(methylmethacrylat) ein. Besonders bevorzugte

Polymerträger schließen EVA-Copolymere (z.B. ELVAX 40, Poly-(Ethylen-Vinylacetat), quervernetzt mit 40 % Vinylacetat; Du-Pont), Poly(Milch-co-Glykolsäure), Polycaprolacton, Polymilchsäure, Copolymere von Poly(Ethylen-Vinylacetat), quervernetzt mit 40 % Vinylacetat, und Polymilchsäure, und Copolymere aus Polymilchsäure und Polycaprolacton ein.

Polymerträger können in einer Vielzahl von Formen hergestellt werden, einschließlich z.B. als Nanosphären oder Mikrosphären, Stab-förmige Vorrichtungen, Pellets, Platten oder Kapseln (siehe z.B. Goodell et al., Am. J. Hosp. Pharm. 43:1454-1461, 1986); Langer et al., "Controlled release of macromolecules from polymers", in Biomedical polymers, Polymeric materials and pharmaceuticals for biomedical use, Goldberg, E.P., Nakagim, A. (Hrg.) Academic Press, S. 113-137, 1980; Rhine et al., J. Pharm. Sci. 69:265-270, 1980; Brown et al., J. Pharm. Sci. 72:1181-1185, 1983; und Bawa et al., J. Controlled Release 1:259-267, 1985).

Vorzugsweise sind anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung (welche ein oder mehrere anti-angiogene Faktoren und einen Polymerträger umfassen) in einer Art und Weise gestaltet, die für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist. In bevorzugten Aspekten der vorliegenden Erfindung sollte die anti-angiogene Zusammensetzung biokompatibel sein und einen oder mehrere anti-angiogene Faktoren über eine Zeitspanne von mehreren Wochen bis Monaten freisetzen. Zusätzlich sollten anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise für mehrere Monate stabil sein und in der Lage sein, unter sterilen Bedingungen hergestellt und gelagert zu werden.

In bestimmten Aspekten der vorliegenden Erfindung können anti-angiogene Zusammensetzungen hergestellt werden in irgendeiner Größe, die von Nanosphären bis Mikrosphären (d.h. von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 500  $\mu\text{m}$ ) reicht, abhängig von der speziellen Verwendung.

Zum Beispiel ist es allgemein bevorzugt, wenn zu Zwecken der Tumorembolisierung (wie unten diskutiert) verwendet, die anti-angiogene Zusammensetzung in Mikrosphären zwischen 15 und 500  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise zwischen 15 und 200  $\mu\text{m}$ , und am bevorzugtesten zwischen 25 und 150  $\mu\text{m}$  herzustellen. Solche Nanopartikel können auch leicht als ein "Spray" angewendet werden, welches sich in einem Film oder einer Beschichtung verfestigt. Nanopartikel (auch als "Nanosphären" bezeichnet) können in einer großen Vielzahl von Größen verwendet werden, einschließlich z.B. von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$ , von 10  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  und von 30  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  (siehe Beispiel 8).

Anti-angiogene Zusammensetzungen können auch hergestellt werden, bei Kenntnis der hierin gelieferten Offenbarung, für eine Vielzahl von anderen Anwendungen. Zum Beispiel können für die Verabreichung von anti-angiogenen Zusammensetzungen an die Hornhaut die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in Polymere eingebaut werden als Nanopartikel (siehe allgemein Kreuter J. Controlled Release 16:169-176, 1991); Couvreur und Vauthier, J. Controlled Release 17:187-198, 1991). Solche Nanopartikel können auch leicht angewendet werden als ein "Spray", welches sich in einem Film oder einer Beschichtung verfestigt. Nanopartikel (auch bezeichnet als "Nanosphären" können verwendet werden in einer großen Vielzahl (?) von Größen, einschließlich z.B. von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$ , von 10  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  und von 30  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  (siehe Beispiel 8).

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch in einer Vielzahl von "Pasten-" oder Gel-Formen hergestellt werden. Zum Beispiel sind in einer Ausführungsform der Erfindung anti-angiogene Zusammensetzungen vorgesehen, die bei einer Temperatur flüssig sind (z.B. Temperatur größer als 37°C, wie 40°C, 45°C, 50°C, 55°C oder 60°C) und fest oder halb-fest bei einer anderen Temperatur (z.B. Umgebungskörpertemperatur, oder irgendeine Temperatur geringer als 37°C).

Solche "Thermopasten" können leicht hergestellt werden, im Lichte der hierin gelieferte Offenbarung (siehe z.B. Beispiele 10 und 14).

In einem noch weiteren Aspekt der Erfindung können die anti-angiogenen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung als ein Film gebildet werden. Vorzugsweise sind derartige Filme im allgemeinen 5, 4, 3, 2 oder 1 mm dick, bevorzugterweise weniger als 0,75 mm oder 0,5 mm dick, und am bevorzugtesten weniger als 500  $\mu\text{m}$  bis 100  $\mu\text{m}$  dick. Solche Filme sind vorzugsweise flexibel mit einer guten Zugfestigkeit (z.B. größer als 50, vorzugsweise weniger als 100 und bevorzugterweise größer als 150 oder 200  $\text{N/cm}^2$ ), gute Adhäsionseigenschaften (d.h. adhärriert leicht an feuchte oder nasse Oberflächen), und weist eine kontrollierte Permeabilität auf. Typische Beispiele derartiger Filme werden in den Beispielen vorgestellt (siehe z.B. Beispiel 13).

Typische Beispiele des Einbaus von anti-angiogenen Faktoren in einen Polymerträger sind detaillierter unten in Beispielen 3, 4 und 8 bis 15 beschrieben.

#### ARTERIELLE EMBOLISIERUNG

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Zusammensetzungen liefert die vorliegende Erfindung auch eine Vielzahl von Verfahren, die die oben beschriebenen anti-angiogenen Zusammensetzungen verwenden. Insbesondere sind in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung Verfahren zum Embolisieren eines Blutgefäßes vorgesehen, umfassend den Schritt, eine therapeutisch wirksame Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung (wie oben beschrieben) in ein Gefäß zu verabreichen, so daß das Blutgefäß wirksam okkludiert wird. Therapeutisch wirksame Mengen, die für Okklusion von Blutgefäßen geeignet sind, können leicht bestimmt werden, im Lichte der unten gelieferte Offenbarung, und

wie beschrieben in Beispiel 6. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die anti-angiogene Zusammensetzung an ein Blutgefäß verabreicht, das einen Tumor versorgt (siehe Fig. 13).

Kurz gesagt gibt es eine Anzahl klinischer Situationen (z.B. Blutung, Tumorentwicklung), wo es wünschenswert ist, die Blutversorgung zu einem Organ oder einer Region zu verringern oder zu beseitigen. Wie detaillierter unten beschrieben, kann dies durch Injektion anti-angiogener Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung in ein erwünschtes Blutgefäß durch einen selektiv positionierten Katheter (siehe Fig. 13) erfolgen. Die Zusammensetzung wandert mittels des Blutstroms bis sie in der Gefäßversorgung festgesetzt wird und dadurch physikalisch (oder chemisch) das Blutgefäß okkludiert. Der verringerte oder unterbundene Blutstrom zu dem ausgewählten Gebiet führt zu einer Infarzierung (Zelltod infolge einer unangemessenen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen) oder verringertem Blutverlust aus einem beschädigten Gefäß.

Zur Verwendung in der Embolisierungstherapie sind anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise nicht toxisch, thrombogen, leicht in Vaskularkathetern hinunter zu injizieren, radio-opak, schnell und permanent wirksam, steril, und leicht in verschiedenen Formen oder Größen zum Zeitpunkt der Prozedur verfügbar. Zusätzlich führen die Zusammensetzungen zur langsamen (ideal über eine Zeitspanne von mehreren Wochen bis Monaten) Freisetzung eines anti-angiogenen Faktors. Besonders bevorzugte anti-angiogene Zusammensetzungen sollten eine vorhersagbare Größe von 15 bis 200  $\mu\text{m}$  aufweisen, nachdem sie in das Vaskularsystem injiziert wurden. Vorzugsweise sollten sie nicht zu größeren Partikeln, entweder in Lösung oder nachdem sie einmal injiziert wurden, verklumpen. Zusätzlich sollten bevorzugte Zusammensetzungen nicht ihre Form oder physikalischen Eigenschaften während der Lagerung vor der

Verwendung ändern.

Embolisierungstherapie kann auf wenigstens drei Hauptwegen verwendet werden, um bei der Handhabung von Neoplasmen zu assistieren: (1) definitive Behandlung von Tumoren (gewöhnlich benigne); (2) für präoperative Embolisierung; und (3) für palliative Embolisierung. Kurz gesagt können benigne Tumore manchmal erfolgreich durch Embolisierungstherapie alleine behandelt werden. Beispiele derartiger Tumoren schließen einfache Tumoren vaskulären Ursprungs (z.B. Hämangiome), endokrine Tumoren, wie Parathyroidadenome und benigne Knochentumoren ein.

Für andere Tumoren (z.B. renale Adenocarcinome), kann präoperative Embolisierung verwendet werden Tage oder Stunden vor der chirurgischen Resektion, um den operative Blutverlust zu verringern, die Dauer der Operation zu verkürzen und das Risiko der Dissemination lebender maligner Zellen durch chirurgische Manipulation des Tumors zu verhindern. Viele Tumore können erfolgreich präoperativ embolisiert werden, einschließlich z.B. nasopharyngealer Tumoren, Glomus-jugulare-Tumoren, Meningiomen, Chemodectomen und vagalen Neuromen.

Embolisierung kann auch verwendet werden als vorrangiger Behandlungsmodus für inoperable Malignitäten, um die Überlebenszeit von Patienten mit fortgeschrittener Krankheit zu verlängern. Die Embolisierung kann eine ausgeprägte Verbesserung der Lebensqualität des Patienten mit malignen Tumoren bedingen durch Vermindern unangenehmer Symptome wie Bluten, venöse Obstruktionen und tracheale Kompression. Die größten Vorteile aus palliativer Tumorembolisierung können jedoch bei Patienten gesehen werden, die unter den humoralen Wirkungen maligner endokrinen Tumoren leiden, wo Metastasen von carcinoiden Tumoren und anderen endokrinen Neoplasmen, wie Insulinomen und Glucagonomen, langsam wachsen können, und doch große Qualen

durch die endokrinen Syndrome bewirken können, die sie produzieren.

Im allgemeinen wird die Embolisierungstherapie, die anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindungen verwendet, typischerweise in einer ähnlichen Weise angewandt, unabhängig von der Stelle. Kurz gesagt wird zuerst eine Angiographie (eine Straßenkarte der Blutgefäße) der Region, die embolisiert werden soll, vorgenommen durch Injektion radiopaken Kontrastes durch einen Katheter, der in eine Arterie oder Vene (abhängig von der Stelle, die embolisiert werden soll) inseriert ist, wenn eine Röntgenaufnahme vorgenommen wird. Der Katheter kann entweder perkutan oder chirurgisch inseriert sein. Das Blutgefäß wird dann embolisiert durch Refluxieren von anti-angiogenen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung durch den Katheter, bis man beobachtet, daß der Strom aufhört. Okklusion kann bestätigt werden durch Wiederholen des Angiogramms.

Embolisierungstherapie führt im allgemeinen zur Verteilung von Zusammensetzungen, die anti-angiogene Faktoren enthalten, durch die Interstizien des Tumors oder der Vaskularmasse, die behandelt werden soll. Die physikalische Masse der embolischen Partikel, die das arterielle Lumen verstopfen, führt zur Okklusion der Blutversorgung. Zusätzlich zu diesem Effekt verhindert die Anwesenheit eines anti-angiogenen Faktors/von anti-angiogenen Faktoren die Bildung neuer Blutgefäße, um den Tumor oder vaskuläre Masse zu versorgen, was die devitalisierende Wirkung des Abschneidens der Blutversorgung verstärkt.

Deshalb sollte es offensichtlich sein, daß eine große Vielzahl von Tumoren embolisiert werden kann unter Verwendung der Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung. Kurz gesagt werden Tumoren typischerweise in zwei Klassen eingeteilt: benigne und



maligne. In einem benignen Tumor behalten die Zellen ihre differenzierten Merkmale bei und teilen sich nicht in einer vollständig unkontrollierten Art und Weise. Zusätzlich ist der Tumor lokalisiert und nicht-metastatisch. In einem malignen Tumor werden die Zellen undifferenziert, antworten nicht auf die Wachstumssignale und hormonellen Signale des Körpers und vermehren sich in einer unkontrollierten Art und Weise; der Tumor ist invasiv und in der Lage, sich auf entfernte Stellen auszubreiten.

In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung können Metastasen (Sekundärtumoren) der Leber behandelt werden unter Verwendung der Embolisierungstherapie. Kurz gesagt ist ein Katheter via der Femoral- oder Brachialarterie inseriert und in die hepatische Arterie fortbewegt, indem er durch das arterielle System unter fluoroskopischer Führung gelenkt wird. Der Katheter wird in den hepatischen Arterienstamm fortbewegt so weit wie notwendig, um vollständige Blockade der Blutgefäße zu erlauben, die den/die Tumore(n) versorgen, während sovieler der arteriellen Äste wie möglich, die normale Strukturen versorgen, verschont werden. Idealerweise wird dies ein segmentaler Zweig der hepatischen Arterie sein, aber es könnte sein, daß die gesamte hepatische Arterie distal zum Ursprung der Gastroduodenalarterie, oder sogar multiple getrennte Arterien blockiert werden müssen, abhängig von Umfang des Tumors und seiner individuellen Blutversorgung. Wenn die erwünschte Katheterposition einmal erreicht ist, wird die Arterie embolisiert durch Injektion von anti-angiogenen Zusammensetzungen (wie hierin beschrieben) durch den arteriellen Katheter, bis der Fluß in der zu blockierenden Arterie aufhört, vorzugsweise selbst nach Beobachtung für 5 Minuten. Okklusion der Arterie kann bestätigt werden durch Injektion von radiopakem Kontrast durch den Katheter und Demonstrieren durch Fluoroskopie oder Röntgenfilm, daß das Gefäß, das zuvor mit Kontrast gefüllt worden ist, dies nicht länger macht. Dieselbe Prozedur kann mit jeder

zu okkludierenden zuführenden Arterie wiederholt werden.

Wie oben festgehalten, können sowohl benigne als auch maligne Tumoren embolisiert werden unter Verwendung von Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung. Typische Beispiele benigner hepatischer Tumoren schließen ein hepatozelluläres Adenom, kavernöses Hämangiom und fokale noduläre Hyperplasien. Andere benigne Tumoren, die selten sind und oftmals keine klinischen Manifestationen aufweisen, können auch behandelt werden. Diese schließen Gallengangadenome, Gallengangzystadenome, Fibrome, Lipome, Leiomyome, Mesotheliome, Teratome, Myxome und noduläre regenerative Hyperplasie ein.

Maligne hepatische Tumoren werden im allgemeinen unterteilt in zwei Kategorien: primäre und sekundäre. Primäre Tumore entstehen direkt aus dem Gewebe, in dem sie gefunden werden. Somit ist ein primärer Lebertumor ursprünglich von den Zellen abgeleitet, die das Lebergewebe ausbilden (wie Hepatozyten und Gallen-Zellen). Typische Beispiele primärer hepatischer Malignitäten, die durch arterielle Embolisierung behandelt werden können, schließen Hepatozellularkarzinome, Cholangiokarzinome, Angiosarkome, Zystadenokarzinome, squamöse Zellkarzinome und Hepatoblastome ein.

Ein Sekundärtumor, oder Metastase, ist ein Tumor, der sonstwo aus dem Körper stammt, aber sich nun in ein entferntes Organ verteilt hat. Die gewöhnlichen Routen für Metastasen sind direktes Wachstum in umgebende Strukturen, Verteilung durch das Vaskular- oder lymphatische System, und Wandern entlang Gewebesebenen und Körperhöhlen (Peritonealflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit, etc.). Sekundäre hepatische Tumoren sind eine der häufigsten Todesursachen bei Krebspatienten und bei weitem die häufigste Form von Lebertumor. Obwohl wirklich jede Malignität in die Leber metastatisieren kann, schließen Tumoren, die sich am wahrscheinlichsten zur Leber verteilen, ein: Krebs

des Magens, des Colons und des Pankreas; Melanome; Tumoren der Lunge, des Oropharynx und der Blase; Hodgkin's und Non-Hodgkin's-Lymphome; Tumoren der Brust, Ovarien und Prostata. Ein jeder der oben genannten Primärtumoren weist viele verschiedene Tumortypen auf, die durch arterielle Embolisierung behandelt werden können (z.B. gibt es über 32 verschiedene Typen von Eierstockkrebs).

Wie oben festgehalten, kann die Embolisierungstherapie, die anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet, auch in einer Vielzahl von anderen klinischen Situationen angewendet werden, wo es erwünscht ist, Blutgefäße zu okkludieren. In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann arteriovenöse Mißbildung behandelt werden durch Verabreichung einer der oben beschriebenen Zusammensetzungen. Kurz gesagt bezeichnet arteriovenöse Mißbildung (vaskuläre Mißbildungen) eine Gruppe von Erkrankungen, wo mindestens ein (und am typischsten viele) abnormale Verbindungen zwischen Arterien und Venen erfolgen, was zu einer lokalen Tumor-ähnlichen Masse führt, die überwiegend zusammengesetzt ist aus Blutgefäßen. Eine derartige Erkrankung kann entweder kongenital oder erworben sein.

In einer Ausführungsform der Erfindung kann eine arteriovenöse Mißbildung behandelt werden durch Insertion eines Katheters via der Femoral- oder Brachialarterie und indem er vorgeschoben wird in die zuführende Arterie unter fluoroskopischer Führung. Der Katheter wird vorzugsweise so weit wie notwendig vorgeschoben, um vollständige Blockierung der Blutgefäße zu erreichen, die die vaskuläre Mißbildung versorgen, wohingegen sovielerlei der arteriellen Zweige, die normale Strukturen versorgen, wie möglich verschont werden (idealerweise wird dies eine einzelne Arterie sein, aber in den meisten Fällen werden multiple getrennte Arterien okkludiert werden müssen, abhängig vom Umfang der vaskulären Fehlbildung und ihrer individuellen

Blutversorgung). Nachdem die erwünschte Katheterposition erreicht ist, kann jede Arterie embolisiert werden unter Verwendung anti-angiogener Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung.

In einem weiteren Aspekt der Erfindung kann Embolisierung vorgenommen werden, um Zustände exzessiven Blutens zu behandeln. Zum Beispiel kann Menorrhagie (exzessives Bluten bei der Menstruation) leicht behandelt werden durch Embolisieren von uterinen Arterien. Kurz gesagt sind die uterinen Arterien Zweige der inneren bilateralen Darmbeinarterie. In einer Ausführungsform der Erfindung kann ein Katheter über die Femoral- oder Brachialarterie eingeführt und vorgeschoben werden in jede uterine Arterie, indem er durch das arterielle System unter fluoroskopischer Führung gesteuert wird. Der Katheter sollte soweit wie notwendig vorgeschoben werden, um vollständige Blockade der Blutgefäße zum Uterus zu erlauben, während sovieler arterielle Verzweigungen wie möglich, die von der uterinen Arterie entstehen und normale Strukturen versorgen, wie möglich verschont werden. Idealerweise kann eine einzelne uterine Arterie auf jeder Seite embolisiert werden, aber gelegentlich kann es sein, daß multiple getrennte Arterien blockiert werden müssen, abhängig von der einzelnen Blutversorgung. Nachdem die erwünschte Katheterposition erreicht ist, kann jede Arterie unter Verabreichung der anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, embolisiert werden.

In einer gleichen Weise kann Embolisierung in einer Vielzahl anderer Zustände, einschließlich z.B. akuter Blutung, vaskulärer Abnormitäten, Erkrankungen des zentralen Nervensystems und Hypersplenismus erfolgen.

VERWENDUNG VON ANTI-ANGIOGENEN ZUSAMMENSETZUNGEN ALS  
BESCHICHTUNGEN FÜR ENDOPROTHESEN

Wie oben festgestellt, liefert die vorliegende Erfindung Endoprothesen, die eine allgemein röhrenförmige Struktur (welche z.B. Spiralformen einschließt), umfaßt, deren Oberfläche mit einer Zusammensetzung, wie oben beschrieben, beschichtet ist. Kurz gesagt ist eine Endoprothese ein Gerüst, gewöhnlicherweise mit zylindrischer Form, die in einen Körperdurchgang (z.B. Gallengänge) inseriert wird, die infolge eines krankhaften Prozesses (z.B. Einwachsen durch einen Tumor) verengt worden sind, um das Verschließen oder Wiederverschließen des Durchganges zu verhindern. Endoprothesen wirken dadurch, daß sie die Wände des Körperdurchgangs, in den sie inseriert worden sind, physikalisch offenhalten.

Eine Vielzahl von Endoprothesen kann verwendet werden innerhalb des Kontextes der vorliegenden Erfindung, einschließlich z.B. ösophagaler Endoprothesen, Vaskularendoprothesen, Gallendoprothesen, pankreatische Endoprothesen, uretherischer und Harnröhrenendoprothesen, lakrimaler Endoprothesen, Endoprothesen der eustachschen Röhre, Fazialliröhrenendoprothese und Trachial-/Bronchialendoprothese.

Endoprothesen können leicht erhalten werden aus kommerziellen Quellen, oder konstruiert werden gemäß den gut bekannten Techniken. Typische Beispiele von Endoprothesen schließen jene ein, die in U.S. Patent Nr. 4,776,337, mit dem Titel "Expandable Intraluminal Graft and Method, and Apparatus for Implanting and Expandable Intraluminal Graft", U.S. Patent Nr. 5,176,626, mit dem Titel "Indwelling Stent", U.S. Patent Nr. 5,147,379, mit dem Titel "Nitinol Stent for Hollow Body Conduits", U.S. Patent Nr. 5,064,435, mit dem Titel "Self-Expanding Prosthesis Having Stable Axial Length", U.S. Patent Nr. 5,052,998, mit dem Titel "Indwelling Stent and Method of Use"

und U.S. Patent Nr. 5,041,126 mit dem Titel "Endovascular Stent" ein, die alle hierin durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit aufgenommen sind.

Endoprothesen können mit anti-angiogenen Zusammensetzungen oder anti-angiogenen Faktoren der vorliegenden Erfindung beschichtet sein unter Verwendung einer Vielzahl von Verfahren, einschließlich z.B.: (a) durch direktes Befestigen einer anti-angiogenen Zusammensetzung auf einer Endoprothese (z.B. entweder durch Besprühen der Endoprothese mit einem Polymer-/Wirkstofffilm oder durch Eintauchen der Endoprothese in eine Polymer-/Wirkstofflösung), (b) durch Beschichten der Endoprothese mit einer Substanz wie einem Hydrogel, das wiederum die anti-angiogene Zusammensetzung (oder den anti-angiogenen Faktor oben) absorbieren wird, (c) durch Einweben eines mit anti-angiogener Zusammensetzung beschichteten Fadens (oder dem Polymer selbst, das zu einem Faden geformt ist) in die Struktur der Endoprothese, (d) durch Inserieren der Endoprothese in eine Hülle oder Sieb, welches aus einer anti-angiogenen Zusammensetzung besteht oder damit beschichtet ist, oder (e) Konstruieren der Endoprothese selbst mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sollte die Zusammensetzung fest an die Endoprothese während der Lagerung und der Zeit der Insertion adhärieren und sollte nicht von der Endoprothese entfernt werden, wenn der Durchmesser von seiner kollabierten Größe zu seiner vollen Expansionsgröße expandiert ist. Die anti-angiogene Zusammensetzung sollte sich auch vorzugsweise nicht während der Lagerung, vor Insertion oder dann zersetzen, wenn sie auf Körpertemperatur erwärmt wird nach Expansion im Körper. Zusätzlich sollte sie die Endoprothese glatt und gleichmäßig beschichten mit einer einheitlichen Verteilung von Angiogeneseinhibitor, während sie die Kontur der Endoprothese nicht verändert. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung sollte die anti-angiogene Zusammensetzung eine uniforme, vorhersagbare, ver-

längerte Freisetzung des anti-angiogenen Faktors in das die Endoprothese umgebende Gewebe vorsehen, nachdem sie einmal eingesetzt wurde. Für vaskuläre Endoprothesen sollte die Zusammensetzung zusätzlich zu den obigen Eigenschaften die Endoprothese nicht thrombogen machen (Blutpfropfen zu bilden verursachen), oder wesentliche Störungen im Blutstrom verursachen (mehr als man von der Endoprothese erwarten würde, wenn sie unbeschichtet wäre).

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Expandieren des Lumens eines Körperdurchgangs, welches umfaßt Inserieren einer Endoprothese in den Durchgang, wobei die Endoprothese eine allgemein tubuläre Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung (oder einem anti-angiogenen Faktor alleine) beschichtet ist, so, daß der Durchgang expandiert ist. Eine Vielzahl von Ausführungsformen wird unten beschrieben, worin das Lumen eines Körperdurchganges expandiert wird, um eine biläre, ösophagale, tracheale/bronchiale, urethrale oder vaskuläre Obstruktion zu verhindern. Zusätzlich ist ein repräsentatives Beispiel detaillierter unten in Beispiel 7 beschrieben.

Allgemein werden Endoprothesen in einer ähnlichen Weise eingesetzt, unabhängig von der Stelle oder der zu behandelnden Krankheit. Kurz gesagt wird zuerst eine Präinsertions-Untersuchung, gewöhnlicherweise ein diagnostisches Bildverfahren, Endoskopie, oder direkte Visualisierung zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs, allgemein vorgenommen, um das geeignete Positionieren für die Insertion der Endoprothese zu bestimmen. Ein Führungsdraht wird dann durch die Läsion oder vorgeschlagene Insertionsstelle vorgeschoben und über diesen wird ein Freisetzungskatheter geleitet, der erlaubt, daß eine Prothese in ihrer kollabierten Form inseriert wird. Typischerweise sind Endoprothesen in der Lage, komprimiert zu werden, so daß sie

durch winzige Kavitäten mittels kleiner Katheter inseriert werden können und dann zu einem größeren Durchmesser expandiert werden, nachdem sie einmal an der erwünschten Stelle sind. Einmal expandiert, zwingt die Endoprothese physikalisch die Wände des Durchganges auseinander und hält sie offen. Als solches sind sie in der Lage, über eine kleine Öffnung eingeführt zu werden und sind dennoch noch in der Lage, eine Höhlung mit einem großen Durchmesser oder Durchgang offenzuhalten. Die Endoprothese kann selbstexpandierend sein (z.B. der Wallstent und Gianturco-Endoprothese) mittels Ballonexpansion (z.B. die Palmaz-Endoprothese und Strecker-Endoprothese), oder durch einen Temperaturwechsel implantiert (z.B. die Nitinol-Endoprothese).

Endoprothesen werden typischerweise an ihren Ort manöviert unter radiologischer oder direkter visueller Kontrolle, wobei besondere Vorsicht waltengelassen wird, um die Endoprothese präzise über der Verengung in dem zu behandelnden Organ zu plazieren. Der Absetzkatheter wird dann zurückgezogen, wobei die Endoprothese zurückgelassen wird, die für sich selbst als Gerüst steht. Eine Untersuchung nach der Insertion verwendet gewöhnlicherweise Röntgen und wird oft verwendet, um die geeignete Positionierung zu bestätigen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Eliminieren von Gallenobstruktionen, die Inserieren einer Gallenendoprothese in einen Gallendurchgang umfaßt, wobei die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur beschichtet ist mit einer Zusammensetzung, wie oben beschrieben, so daß die Gallenobstruktion eliminiert wird. Kurz gesagt wird Tumor über Wachstum der gewöhnlichen Gallengänge zu progressivem Verschlusßikterus, der mit dem Leben nicht vereinbar ist. Im allgemeinen ist das Gallensystem, welches Gallenflüssigkeit aus der Leber in das Duodenum abführt am häufigsten verlegt durch



(1) einen Tumor, der aus Gallengangzellen zusammengesetzt ist (Cholangiokarzinom), (2) einen Tumor, der den Gallengang invadiert (z.B. pankreatisches Karzinom), oder (3) einen Tumor, der extrinsischen Druck ausübt und den Gallengang zusammen-drückt (z.B. vergrößerte Lymphknoten).

Sowohl primäre Gallentumoren ebenso wie andere Tumoren, die Kompression der Gallenwege verursachen, können behandelt werden unter Verwendung der Endoprothesen, wie hierin beschrieben. Ein Beispiel primärer Gallentumoren sind Adenokarzinome (die auch als Klatskin-Tumoren bezeichnet werden, wenn sie an der Bifurkation des gewöhnlichen Leberduktus gefunden werden. Diese Tumoren werden auch als Gallenkarzinome, Chole-docholangiokarzinome oder Adenokarzinome des Gallensystems bezeichnet. Benigne Tumoren, die den Gallengang betreffen (z.B. Adenom des Gallensystems) und, in seltenen Fällen, squamöse Zellkarzinome des Gallengangs und Adenokarzinome der Gallenblase, können auch Kompression der Gallenwege verursachen und deshalb zu Gallenobstruktion führen.

Kompression der Gallenwege ist gewöhnlich durch Tumoren der Leber und des Pankreas bedingt, die die Gänge komprimieren und demzufolge verengen. Die meisten der Tumoren des Pankreas entstehen aus Zellen des Pankreasganges. Dies ist eine hoch fatale Form von Krebs (5 % aller Krebstoten, 26.000 neue Fälle pro Jahr in den Vereinigten Staaten) mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 6 Monaten und einer Einjahresüberlebensrate von 10 %. Wenn diese Tumoren im Kopf des Pankreas lokalisiert sind, verursachen sie häufig Gallenobstruktionen und dies ist der Lebensqualität des Patienten wesentlich abträglich. Während alle Typen von pankreatischen Tumoren im allgemeinen als "Karzinom des Pankreas" bezeichnet werden, gibt es histologische Subtypen, einschließlich: Adenokarzinom, adenosquamoses Karzinom, Zystadeno-Karzinom und azinäres Zellkarzinom. Lebertumoren, wie oben diskutiert, können auch Kompression der Gal-

lenwege verursachen und somit Obstruktion der Gallengänge verursachen.

In einer Ausführungsform der Erfindung wird eine Gallen-Endoprothese zuerst in einen Gallendurchgang auf einem von mehreren Wegen inseriert: vom oberen Ende durch Inserieren einer Nadel durch die Abdominalwand und durch die Leber (ein perkutanes transhepatisches Cholangiogramm oder "PTC"); vom Bodenende durch Kanülieren des Gallenganges durch ein Endoskop, das durch den Mund, den Magen oder Duodenum inseriert ist (ein endoskopisches retrogrades Cholangiogramm oder "ERCP"); oder durch direkte Inzision während eines chirurgischen Eingriffs. Eine Untersuchung vor der Insertion, PTC, ERCP oder direkte Visualisierung zum Zeitpunkt der Operation sollte allgemein vorgenommen werden, um die geeignete Position für Insertion der Endoprothese zu bestimmen. Ein Führungsdraht wird dann durch die Läsion vorgeschoben und über diesen wird ein Absetzkatheter geführt, um zu erlauben, daß die Endoprothese in ihrer kollabierten Form inseriert wird. Wenn die diagnostische Untersuchung eine PTC war, wird der Führungsdraht und der Absetzkatheter über die Abdominalwand inseriert werden, während wenn die ursprüngliche Untersuchung ein ERCP war, die Endoprothese über den Mund plaziert werden wird. Die Endoprothese wird dann unter radiologischer, endoskopischer oder direkter visueller Kontrolle positioniert, wobei besondere Sorgfalt verwendet wird, um sie präzise über der Verengung im Gallengang zu plazieren. Der Absetzkatheter wird entfernt werden, wobei die Endoprothese als ein Gerüst stehen bleibt, das den Gallengang offen hält. Ein weiteres Cholangiogramm wird vorgenommen werden, um zu dokumentieren, daß die Endoprothese in geeigneter Weise positioniert ist.

In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Eliminieren ösophagealer Obstruktionen, die Inserieren einer ösophagealen Endoprothese in den

Ösophagus vorsehen, wobei die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, beschichtet ist, so daß die Ösophagale Obstruktion eliminiert wird. Kurz gesagt ist der Ösophagus die Hohlröhre, die Nahrung und Flüssigkeiten aus dem Mund zum Magen transportiert. Krebs des Ösophagus oder Invasion durch Krebs, welcher in benachbarten Organen seinen Ursprung hat (z.B. Krebs des Magens oder der Lunge), führt zur Unfähigkeit, Nahrung oder Speichel zu schlucken. In dieser Ausführungsform sollte eine Untersuchung vor Insertion, gewöhnlicherweise ein Schluck Barium oder Endoskopie, allgemein vorgenommen werden, um die geeignete Position für Insertion der Endoprothese zu bestimmen. Ein Katheter oder Endoskop kann dann durch den Mund positioniert werden und ein Führungsdraht wird durch die Blockade vorgeschoben. Ein Endoprothesen-Absetzkatheter wird über den Führungsdraht unter radiologischer oder endoskopischer Kontrolle geschoben und eine Endoprothese wird präzise über die Verengung im Ösophagus plziert. Eine Untersuchung nach Insertion, gewöhnlicherweise eine Röntgenaufnahme eines Schluckes Barium, kann verwendet werden, um geeignetes Positionieren zu bestimmen.

In anderen Ausführungsformen der Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Eliminieren trachealer/bronchialer Obstruktionen, die umfassen Inserieren einer trachealen/bronchialen Endoprothese in die Trachea oder die Bronchien, wobei die Endoprothese eine im allgemeinen röhrenförmige Struktur aufweist, ihre Struktur beschichtet ist mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, so daß die tracheale/bronchiale Obstruktion eliminiert wird. Kurz gesagt sind die Trachea und die Bronchien Röhren, die Luft vom Mund oder der Nase zu den Lungen transportieren. Blockade der Trachea durch Krebs, Insertion von Krebs, der seinen Ursprung in benachbarten Organen hat (z.B. Krebs der Lunge), oder Kollabieren der Trachea oder Bronchien aufgrund von Chondromalazie (Schwächen der

Knorpelspangen) führt zur Unfähigkeit, zu atmen. In dieser Ausführungsform der Erfindung sollte Untersuchung vor der Insertion, gewöhnlicherweise eine Endoskopie, vorgenommen werden, um die geeignete Position für Insertion der Endoprothese zu bestimmen. Ein Katheter oder Endoskop wird dann durch den Mund positioniert und ein Führungsdraht durch die Blockade vorgeschoben. Ein Absetzkatheter wird dann über den Führungsdraht vorgeschoben, um zu erlauben, eine kollabierte Prothese zu inserieren. Die Endoprothese wird dann unter radiologischer oder endoskopischer Kontrolle inseriert, um sie präzise über der Verengung zu plazieren. Der Absetzkatheter kann dann entfernt werden und läßt die Endoprothese zurück, die für sich als Gerüst steht. Eine Untersuchung nach Insertion, gewöhnlicherweise eine Bronchoskopie, kann verwendet werden, um geeignetes Positionieren zu bestimmen.

In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren vorgesehen zum Eliminieren urethraler Obstruktionen, welche umfassen Inserieren einer urethralen Endoprothese in eine Harnröhre, wobei die Endoprothese eine allgemein tubuläre Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur beschichtet ist mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, so daß die urethrale Obstruktion eliminiert wird. Kurz gesagt ist die Harnröhre eine Röhre, die die Blase durch den Penis entleert. Extrinsisches Verengen der Harnröhre, wenn sie infolge Hypertrophie der Prostata durch die Prostata hindurchführt, tritt bei tatsächlich jedem Mann mit einem Alter über 60 auf und verursacht progressive Schwierigkeiten beim Harnlassen. In dieser Ausführungsform sollte eine Untersuchung vor der Insertion, gewöhnlicherweise eine Endoskopie oder ein Urethrogramm, im allgemeinen zuerst vorgenommen werden, um die geeignete Position für Insertion der Endoprothese zu bestimmen, die über dem externen Harnschließmuskel am unteren Ende ist, und schließen, um mit dem Harnblasenhals am oberen Ende unter Wasser zu setzen. Ein Endoskop oder Katheter wird durch

die Penisöffnung eingeführt und ein Führungsdraht in die Blase vorgeschoben. Ein Absetzkatheter wird dann über den Führungsdraht geschoben, um Endoprotheseninsertion zu erlauben. Der Absetzkatheter wird dann entfernt und die Endoprothese an ihrer Stelle expandiert. Eine Untersuchung auf Insertion, gewöhnlicherweise Endoskopie und retrogrades Urethrogramm, kann verwendet werden, um geeignete Position zu bestätigen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Eliminieren vaskulärer Obstruktionen, die umfassen Inserieren einer vaskulären Endoprothese in ein Blutgefäß, wobei die Endoprothese eine allgemein röhrenförmige Struktur aufweist, die Oberfläche der Struktur mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, beschichtet ist, so daß die vaskuläre Obstruktion eliminiert wird. Kurz gesagt können Endoprothesen in eine große Anzahl von Blutgefäßen, sowohl Arterien als auch Venen, plaziert werden, um wieder auftretende Stenose an der Stelle fehlgeschlagener Angioplastiken zu verhindern, um Verengungen zu behandeln, die wahrscheinlich versagen würden, wenn mit Angioplastiken behandelt, und um post-operative Verengungen (z.B. Dialysetransplantat) zu behandeln. Typische Beispiele geeigneter Stellen schließen die ilialen, renalen und coronaren Arterien, die vena cava superior und in Dialysetransplantaten ein. In einer Ausführungsform wird Angiographie zuerst vorgenommen, um die Stelle zum Plazieren der Endoprothese zu lokalisieren. Dies wird typischerweise vorgenommen durch Injektion radioopaken Kontrastes durch einen Katheter, der durch eine Arterie oder Vene eingeführt wird, wenn eine Röntgenaufnahme gemacht wird. Der Katheter kann dann inseriert werden, entweder perkutan oder durch Chirurgie, in die Femoralarterie, Brachialarterie, Femoralvene oder Brachialvene, und in das geeignete Blutgefäß vorgeschoben werden, indem er durch das Vaskularsystem unter fluoroskopischer Führung gesteuert wird. Eine Endoprothese kann dann über die vaskuläre Stenose positioniert werden. Ein

Angiogramm nach Insertion kann verwendet werden, um geeignetes Positionieren zu bestätigen.

#### VERWENDUNG ANTI-ANGIOGENER ZUSAMMENSETZUNGEN IN CHIRURGISCHEN EINGRIFFEN

Wie oben festgehalten, können anti-angiogene Zusammensetzungen in einer großen Vielzahl von chirurgischen Eingriffen verwendet werden. Zum Beispiel können anti-angiogene Zusammensetzungen in einem Aspekt der Erfindung (in der Form von, beispielsweise, eines Sprays oder Films) verwendet werden, um eine Fläche zu beschichten oder zu besprühen, vor Entfernung eines Tumors, um normales umgebendes Gewebe von malignem Gewebe zu isolieren und/oder die Verbreitung der Erkrankung auf umgebendes Gewebe zu verhindern. In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung können anti-angiogene Zusammensetzungen (z.B. in der Form eines Sprays) via endoskopischer Eingriffe verabreicht werden, um Tumoren zu beschichten, oder Angiogenese an einer erwünschten Stelle zu inhibieren. In noch einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung können chirurgische Netze, die mit anti-angiogenen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung beschichtet wurden, verwendet werden, in irgendwelchen Eingriffen, worin ein chirurgisches Netz verwendet werden kann. Zum Beispiel kann in einer Ausführungsform der Erfindung ein chirurgisches Netz, das mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung beladen ist, verwendet werden, während Abdominalkrebsresektionschirurgie (z.B. nach Colonresektion), um dem Gewebe eine Stütze zu liefern und eine Menge an anti-angiogenen Faktoren freizusetzen.

In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Behandeln von Tumorexzisionsstellen, die umfassen Verabreichen einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, zu den Resektionsrändern eines Tumors

nach Exzision, so daß das örtliche Wiederauftreten von Krebs und die Bildung neuer Blutgefäße an der Stelle inhibiert wird. In einer Ausführungsform der Erfindung wird/werden die anti-angiogene(n) Zusammensetzung(en) (oder anti-angiogenen Faktor(en) alleine) direkt an die Tumorexzisionsstelle verabreicht (z.B. aufgetragen durch Tupfen, Bürsten oder anders geartetes Beschichten der Resektionsränder des Tumors mit der/den anti-angiogenen Zusammensetzung(en) oder Faktor(en)). Alternativ kann/können die anti-angiogenen Zusammensetzung(en) oder Faktor(en) eingebaut werden in bekannte chirurgische Pasten vor der Verabreichung. In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung werden die anti-angiogenen Zusammensetzungen nach hepatischer Resektion wegen Malignität und nach neurochirurgischen Operationen angewandt.

In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung können die anti-angiogenen Zusammensetzungen (wie oben beschrieben) an den Resektionsrändern einer großen Vielzahl von Tumoren verabreicht werden, einschließlich z.B. Brust-, Cholon-, Hirn- und Lebertumoren. Zum Beispiel können in einer Ausführungsform der Erfindung anti-angiogene Zusammensetzungen an die Stelle eines neurologischen Tumors nach Exzision verabreicht werden, so daß die Bildung neuer Blutgefäße inhibiert wird. Kurz gesagt ist das Gehirn hochfunktional lokalisiert; d.h. jede spezifische anatomische Region ist spezialisiert, um eine spezifische Funktion auszuführen. Deshalb ist die Stelle einer Hirnpathologie oft wichtiger als ihre Art. Eine relativ kleine Läsion in einer Schlüsselregion kann viel schlimmer sein als eine viel größere Läsion in einer weniger wichtigen Region. In ähnlicher Weise kann eine Läsion an der Oberfläche des Hirns leicht chirurgisch entfernt werden, während für denselben Tumor, tief im Gehirn, lokalisiert, dies nicht möglich ist (man müßte zu viele vitale Strukturen durchschneiden, um ihn zu erreichen). Sogar benigne Tumoren können auch aus mehreren Gründen gefährlich sein: Sie können in einer Schlüsselregion

wachsen und wesentlichen Schaden bedingen; selbst wenn sie durch chirurgische Resektion geheilt werden würden, kann dies nicht möglich sein; und schließlich, wenn sie nicht überprüft werden, können sie zunehmenden intrakranialen Druck verursachen. Der Schädel ist ein umschlossener Raum, der nicht expandieren kann. Deshalb muß, wenn etwas an einer Stelle wächst, etwas anderes an einer anderen Stelle komprimiert werden; das Ergebnis ist erhöhter Druck im Schädel oder erhöhter intrakranialer Druck. Wenn ein solcher Zustand unbehandelt bleibt, können vitale Strukturen komprimiert werden, was zum Tode führt. Das Auftreten von CNS (zentrales Nervensystem)-Malignitäten beträgt 8 bis 10 pro 100.000. Die Prognose primärer Malignitäten des Gehirns ist mit einem mittleren Überleben von weniger als einem Jahr bedrückend, selbst nach chirurgischer Resektion. Diese Tumoren, besonders Glioma, sind vorherrschend eine lokale Erkrankung, die innerhalb von 2 cm des ursprünglichen Erkrankungsherd nach chirurgischer Entfernung wieder auftreten.

Typische Beispiele von Gehirntumoren, die behandelt werden können unter Verwendung der Zusammensetzungen und Verfahren, wie hierin beschrieben, schließen gliale Tumore (wie anaplastisches Astrocytom, multiformes Glioblastom, pilocytisches Astrocytom, Oligodendrogliom, Ependymom, myxopapilläres Ependymom, Subependymom, Adergeflecht-Papillom); neuronale Tumoren (z.B. Neuroblastom, Ganglioneuroblastom, Ganglioneurom und Medulloblastom); Epiphysen-Tumoren (z.B. Pineoblastom und Pineocytom); meningeale Tumoren (z.B. Meningiom, meningeales Hämangioperiocytoom; meningiales Sarkom); Tumoren von Nervenscheidenzellen (z.B. Schwannom (Neurolemmoma) und Neurofibrom); Lymphome (z.B. Hodgkin's- und Non-Hodgkin's-Lymphom (einschließlich vieler Subtypen, sowohl primäre als auch sekundäre); malformative Tumore (z.B. Craniopharyngiom, epidermoide Zysten, dermoide Zysten und colloide Zysten); und metastatische Tumoren, die tatsächlich von einem jeden Tumor abgeleitet



sein können, wobei die am häufigsten auftretenden von Lungen-, Brust-, Melanom-, Nierentumoren und Tumoren des Gastrointestinaltraktes stammen).

#### ANDERE THERAPEUTISCHE VERWENDUNGEN VON ANTI-ANGIOGENEN ZUSAMMENSETZUNGEN

Zusätzlich zu Tumoren können viele andere nicht-tumorbildende Angiogenese-abhängige Erkrankungen, die durch abnormales Wachstum von Blutgefäßen gekennzeichnet sind, auch mit den anti-angiogenen Zusammensetzungen, oder anti-angiogenen Faktoren der vorliegenden Erfindung behandelt werden. Typische Beispiele solcher nicht-tumorbildenden Angiogenese-abhängigen Erkrankungen schließen corneale Neovaskularisierung, hypertrophe Narben und Keloide, proliferative diabetische Retinopathie, rheumatoide Arthritis, arteriovenöse Mißbildungen (oben diskutiert), atherosklerotische Plaques, verzögerte Wundheilung, hämophile Gelenke, nicht geheilte Brüche, Osler-Weber-Syndrom, Psoriasis, pyogenes Granulom, Scleroderma, Trakoma, Menorrhagie (oben diskutiert) und vaskuläre Adhäsionen ein.

Insbesondere in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Behandeln cornealer Neovaskularisierung (einschließlich Neovaskularisierung von cornealem Gewebe), welches die Schritte umfaßt Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung (wie oben beschrieben) zur Cornea, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird. Kurz gesagt ist die Cornea ein Gewebe, dem normalerweise Blutgefäße fehlen. In bestimmten pathologischen Zuständen jedoch können sich Kapillaren in die Cornea aus dem pericornealen vaskulären Plexus des Limbus in die Cornea hineinerstrecken. Wenn die Cornea vaskularisiert wird, wird sie auch trübe werden, was zu einer Verringerung der visuellen Schärfe des Patienten führt. Vollständiger Verlust der Sehkraft tritt ein, wenn die Cornea vollständig ein-

trübt.

Blutgefäße können in die Cornea in einer Vielzahl von Mustern und Tiefen eindringen, abhängig vom Prozeß, der die Neovaskularisierung anregt. Diese Muster sind traditionell von Augenärzten definiert worden in folgende Typen: Pannus trachomatous, Pannus leprosus, Pannus phlyctenulosus, Pannus degenerativus und glaukomatöser Pannus. Das corneale Stroma kann auch durch Zweige der vorderen Ciliararterie invadiert werden (genannt interstitielle Vaskularisierung), was verschiedene distinkte klinische Läsionen verursacht: terminale Schlaufen, ein "Besen-ähnliches"-Muster, eine Doldenform, eine Netz-Form, interstitielle Arkaden (von episkleralen Gefäßen) und aberrante unregelmäßige Gefäße.

Eine große Breite von Erkrankungen kann zu cornealer Neovaskularisierung führen, einschließlich z.B. corneale Infektionen (z.B. Trachoma, Herpes simplex-Keratitis, Leishmaniasis und Onchocerciasis), immunologische Prozesse (z.B. Gewebeabstoßung und Stevens-Johnson's-Syndrom), Alkaliverbrennungen, Trauma, Entzündung (von beliebiger Ursache), toxische und Mangelernährungszustände und als eine Komplikation des Tragens von Kontaktlinsen.

Während die Ursache von cornealer Neovaskularisierung variieren kann, ist die Antwort der Cornea auf den plötzlich einsetzenden Krankheitszustand und das nachfolgende vaskuläre Einwachsen ähnlich, unabhängig von der Ursache. Kurzgesagt scheint die Stelle der Verletzung von Bedeutung, da nur jene Läsionen eine angiogene Antwort hervorrufen, die in einer kritischen Entfernung des Limbus befindlich sind. Dies beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, daß die angiogenen Faktoren, die für Hervorrufen der vaskulären Invasion verantwortlich sind, an der Stelle der Läsion erzeugt werden und zu der Stelle des nächsten Blutgefäßes (dem Limbus) diffundieren müssen,

um ihre Wirkung auszuüben. In einer bestimmten Entfernung vom Limbus wäre dies nicht länger möglich und das limbische Endothelium würde nicht induziert werden, um in die Cornea einzuwachsen. Verschiedene angiogene Faktoren sind wahrscheinlich in diesem Prozeß involviert, von denen viele Produkte der Entzündungsreaktion sind. In der Tat scheint Neovaskularisierung der Cornea nur in Verbindung mit einem inflammatorischen Zellinfiltrat aufzutreten und der Umfang von Angiogenese ist proportional dem Umfang der Entzündungsreaktion. Corneales Ödem erleichtert weiter ein Einwachsen von Blutgefäßen durch Lockern des Rahmenwerks des cornealen Stromas und Liefern eines Weges des "geringsten Widerstandes" durch den die Kapillaren wachsen können.

Nach der anfänglichen Entzündungsreaktion erfolgt kapilläres Wachstum in die Cornea in derselben Weise, wie es in anderen Geweben erfolgt. Die normalerweise verborgenen Endothelzellen der limbischen Kapillaren und Venolen werden stimuliert, um sich zu teilen und zu wandern. Die Endothelzellen weisen weg von ihren Ursprungsgefäßen, verdauen die umgebende Basalmembran und das Gewebe, durch das sie reisen, und wandern zu der Quelle des angiogenen Stimulus. Die blindendigen Aussprossungen erreichen ein Lumen und anastomosieren zusammen, um Kapillarschlaufen zu bilden. Das Endergebnis ist der Aufbau eines vaskularen Plexus im cornealen Stroma.

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung sind hilfreich beim Blockieren der stimulatorischen Wirkungen von Angiogenese-Promotoren, Reduzieren endothelialer Zellteilung, Verringern endothelialer Zellmigration und Verleihen der Aktivität der proteolytischen Enzyme, die durch das Endothel sekretiert werden.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung kann ein anti-angiogener Faktor hergestellt werden für topische

Verabreichung in Saline (kombiniert mit irgendeinem der Konservierungsmittel und antimikrobiellen Agenzien, die gewöhnlich in okularen Präparaten verwendet werden), und in Augentropfenform verabreicht werden. Die anti-angiogene Faktor-Lösung kann verwendet werden in ihrer reinen Form und mehrmals täglich verabreicht werden. Alternativ können anti-angiogene Zusammensetzungen, hergestellt wie oben beschrieben, auch direkt auf die Cornea aufgetragen werden. In bevorzugten Ausführungsformen wird die anti-angiogene Zusammensetzung hergestellt mit einem muco-adhäsiven Polymer, das an die Cornea bindet. In weiteren Ausführungsformen können die anti-angiogenen Faktoren oder anti-angiogenen Zusammensetzungen verwendet werden zusätzlich zur herkömmlichen Steroidtherapie.

Topische Therapie kann prophylaktisch hilfreich sein bei cornealen Läsionen, die dafür bekannt sind, daß sie eine große Wahrscheinlichkeit aufweisen, eine angiogene Antwort (wie chemische Verbrennungen) zu induzieren. In diesen Fällen kann die Behandlung, wahrscheinlich in Kombination mit Steroiden, unmittelbar eingestellt werden, um zu helfen, nachfolgende Komplikationen zu vermeiden.

In anderen Ausführungsformen kann die oben beschriebene anti-angiogene Zusammensetzung direkt in das corneale Stroma durch einen Augenarzt unter mikroskopischer Führung injiziert werden. Die bevorzugte Injektionsstelle kann variieren mit der Morphologie der einzelnen Läsion, aber das Ziel der Verabreichung wäre, die Zusammensetzung an der fortschreitenden Form der Vaskulatur zu plazieren (d.h. eingestreut) zwischen den Blutgefäßen und der normalen Cornea). In den meisten Fällen würde dies perilimbische corneale Injektion umfassen, um die Cornea vor den fortschreitenden Blutgefäßen zu "schützen". Dieses Verfahren kann auch kurz nach einer Corneaverletzung verwendet werden, um prophylaktisch corneale Neovaskularisierung zu verhindern. In dieser Situation sollte das Material in

die perilimbische Cornea injiziert werden, eingestreut zwischen der cornealen Läsion und ihrer unerwünschten limbischen Blutversorgung. Solche Verfahren können verwendet werden in einer ähnlichen Weise, um Kapillarinvasion von transplantierten Corneen zu verhindern. In einer Freisetzungsform, die anhaltend freisetzt, könnten Injektionen nur 2 bis 3 mal pro Jahr erforderlich sein. Ein Steroid könnte auch zu der Injektionslösung hinzugefügt werden, um Entzündung, die aus der Injektion selbst herrührt, zu verringern.

In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Behandeln von hypertrophen Narben und Keloiden, welches die Schritte umfaßt Verabreichen einer der oben beschriebenen anti-angiogenen Zusammensetzungen zu einer hypertrophen Narbe oder Keloid.

Kurz gesagt erfolgt Heilung von Wunden und Narbenbildung in drei Phasen: Entzündung, Proliferation und Reifung. Die erste Phase, Entzündung, erfolgt in Antwort auf eine Verletzung, die schwer genug ist, um die Haut zu durchbrechen. Während dieser Phase, die 3 bis 4 Tage dauert, bilden Blut und Gewebeflüssigkeit ein adhäsives Koagulum und fibrinöses Netzwerk, welches dazu dient, die Wundoberflächen zusammenzubinden. Dem folgt dann eine proliferative Phase, in der Einwachsen von Kapillaren und Bindegewebe von den Wundkanten erfolgt und Schließen des Hautdefektes. Schließlich, nachdem kapillare und fibroblastische Proliferation aufgehört hat, beginnt der Reifungsprozeß, wobei die Narbe kontrahiert und weniger zellulär, weniger vaskulär und flach und weiß erscheint. Die letzte Phase kann zwischen 6 und 12 Monaten dauern.

Wenn zuviel Bindegewebe produziert wird und die Wunde persistent zellulär bleibt, kann die Narbe rot und erhöht werden. Wenn die Narbe innerhalb der Grenzen der ursprünglichen Wunde bleibt, wird sie als eine hypertrophe Narbe bezeichnet, aber

wenn sie sich jenseits der ursprünglichen Narbe und in das umgebende Gewebe erstreckt, wird die Läsion als Keloid bezeichnet. Hypertrophe Narben und Keloide werden während der zweiten und dritten Phase der Narbenbildung produziert. Mehrere Wunden neigen besonders zu exzessiver endothelialer und fibroblastischer Proliferation, einschließlich Verbrennungen, offenen Wunden und infizierte Wunden. Bei hypertrophen Narben erfolgt ein Maß an Reifung und gradueller Verbesserung. Im Falle von Keloiden jedoch wird ein wirklicher Tumor produziert, der ziemlich groß werden kann. Spontane Verbesserung in solchen Fällen erfolgt selten.

Deshalb werden in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entweder anti-angiogene Faktoren alleine, oder anti-angiogene Zusammensetzungen, wie oben beschrieben, direkt in eine hypertrophe Narbe oder Keloid injiziert, um Progression dieser Läsionen zu verhindern. Die Injektionsfrequenz wird abhängen von den Freisetzungskinetiken des verwendeten Polymers (falls vorhanden) und der klinischen Antwort. Diese Therapie ist besonders wertvoll bei einer prophylaktischen Behandlung von Zuständen, die dafür bekannt sind, daß sie zur Entwicklung von hypertrophen Narben und Keloiden führen (z.B. Verbrennungen) und wird vorzugsweise initiiert, nachdem die proliferative Phase Zeit hatte, zu progressieren (etwa 14 Tage nach der anfänglichen Verletzung), aber vor der Entwicklung von hypertropher Narbe oder Keloid.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Verfahren vorgesehen zum Behandeln von neovaskularem Glaukom, welches die Schritte umfaßt Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung zum Auge, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird.

Kurz gesagt ist neovaskuläres Glaukom ein pathologischer Zustand, wo sich neue Kapillaren in der Iris des Auges entwic-

keln. Die Angiogenese stammt ursprünglich aus Gefäßen, die am Pupillenrand lokalisiert sind und schreitet über die Wurzel der Iris in das Trabekelnetzwerk fort. Fibroblasten und andere Bindegewebsselemente sind mit dem Kapillarwachstum verbunden und eine fibrovaskuläre Membran entwickelt sich, die sich über die vordere Oberfläche der Iris ausbreitet. Schließlich erreicht dieses Gewebe den vorderen Kammerwinkel, wo es Verwachsungen bildet. Diese Verwachsungen wiederum vereinigen sich, vernarben und kontrahieren, um letztendlich den vorderen Kammerwinkel zu verschließen. Die Narbenbildung verhindert adäquaten Abfluß von wässrigem Humor durch den Winkel und in das Trabekelnetzwerk, was zu einem Anstieg des intraokularen Drucks führt, der zur Blindheit führen kann.

Neovaskuläres Glaukom tritt im allgemeinen als eine Komplikation von Erkrankungen auf, bei denen retinale Ischämie vorherrschend ist. Insbesondere haben ein Drittel der Patienten mit dieser Erkrankung diabetische Retinopathie und 28 % Okklusion der zentralen retinalen Vene. Andere Ursachen schließen chronische retinale Ablösung, Endstadium-Glaukom, obstruktive Erkrankung der Carotidarterie, retrolentale Fibroplasie, Sichelzellenanämie, intraokuläre Tumoren und cavernöse Carotid-fisteln ein. In diesen frühen Phasen kann neovaskuläres Glaukom durch Spaltlampen-Biomikroskopie bei großer Vergrößerung diagnostiziert werden, wo sie kleine, dilatierte, disorganisierte Kapillaren (die Fluorescein freisetzen) auf der Oberfläche der Iris enthüllt. Später zeigt Gonioskopie progressive Obliteration des vorderen Kammerwinkels durch fibrovaskuläre Ligamente. Während der vordere Kammerwinkel noch offen ist, können die konservativen Therapien hilfreich sein. Wenn sich jedoch der Winkel schließt, bedarf es eines operativen Eingriffs, um den Druck zu vermindern. Deshalb können in einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung anti-angiogene Faktoren (entweder alleine oder in einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben) topisch dem Auge verabreicht

werden, um frühe Formen neovaskularen Glaukoms zu behandeln.

In anderen Ausführungsformen der Erfindung können anti-angiogenen Zusammensetzungen durch Injektion der Zusammensetzung in die Region des vorderen Kammerwinkels implantiert werden. Dies sieht eine anhaltende lokalisierte Erhöhung von anti-angiogenem Faktor vor und verhindert Wachstum des Blutgefäßes in die Region. Implantierte oder injizierte anti-angiogene Zusammensetzungen, die zwischen den vorgerückten Kapillaren der Iris und dem vorderen Kammerwinkel plaziert sind, können den offenen Winkel gegen Neovaskularisieren "verteidigen". Da Kapillaren nicht innerhalb eines wesentlichen Radiuses der anti-angiogenen Zusammensetzung wachsen werden, könnte die Durchgängigkeit des Winkels aufrechterhalten werden. In anderen Ausführungsformen kann die anti-angiogene Zusammensetzung auch an eine Stelle plaziert werden, so daß der anti-angiogene Faktor kontinuierlich in den wässrige Humor freigesetzt wird. Dies würde die Konzentration an anti-angiogenen Faktor im Humor erhöhen, der wiederum die Oberfläche der Iris und ihre unnormalen Kapillaren badet, wodurch ein weiterer Mechanismus vorgesehen wird, mittels dessen das Medikament appliziert wird. Diese therapeutischen Modalitäten können auch prophylaktisch und in Verbindung mit existierenden Behandlungen hilfreich sein.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Behandeln proliferativer diabetischer Retinopathie, welche den Schritt umfassen Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung zu den Augen, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird.

Kurz gesagt glaubt man, daß die Pathologie diabetischer Retinopathie ähnlich ist der oben für neovaskulares Glaukom beschriebenen. Insbesondere glaubt man, daß diabetische Hinter-



grundretinopathie in proliferative diabetische Retinopathie unter dem Einfluß retinaler Hypoxie konvertiert. Allgemein sproßt neovaskuläres Gewebe vom optischen Nerv (gewöhnlicherweise innerhalb 10 mm von der Kante) und von der Oberfläche der Retina in Regionen, wo Gewebepерfusion gering ist. Anfänglich wachsen die Kapillaren zwischen der inneren limitierenden Membran der Retina und der hinteren Glaskörperfläche. Schließlich wachsen die Gefäße in den Glaskörper und durch die innere limitierende Membran. Wenn der Glaskörper kontrahiert wird Zug auf die Gefäße ausgeübt, was oft dazu führt, daß die Blutgefäße gesichert werden und der Glaskörper infolge Hämorrhagie erblindet. Fibröses Ziehen vom Vernarben in der Retina kann auch retinale Ablösung hervorrufen.

Die herkömmliche Therapie der Wahl ist panretinale Photokoagulation, um retinales Gewebe zu verringern und dadurch den retinalen Sauerstoffbedarf zu verringern. Obwohl anfangs wirksam gibt es eine hohe Rückfallrate mit neuen Läsionen, die sich in anderen Teilen der Retina bilden. Komplikationen dieser Therapie schließen eine Verringerung der peripheren Sicht von bis zu 50 % der Patienten, mechanische Abrasionen der Cornea, Laser-induzierte Kataraktbildung, akutes Glaukom und Stimulieren subretinalen neovaskulären Wachstums (was zum Verlust des Sehens führen kann) ein. Als ein Ergebnis wird diese Prozedur nur vorgenommen, wenn verschiedene Risikofaktoren vorliegen und das Verhältnis Risiko zu Nutzen klar zu Gunsten des Eingriffs ist.

Deshalb kann in einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung proliferative diabetische Retinopathie behandelt werden durch Injektion eines anti-angiogenen Faktors/anti-angiogenen Faktoren (oder anti-angiogener Zusammensetzung) in den wässrigen Humor oder den Glaskörper, um die örtliche Konzentration von anti-angiogenem Faktor in der Retina zu erhöhen. Vorzugsweise sollte diese Behandlung vor der Ausbildung

einer schweren Erkrankung, die Photokoagulation nötig macht, begonnen werden. In anderen Ausführungsformen der Erfindung können Arterien, die die neovaskulären Läsionen versorgen, embolisiert werden (unter Verwendung von anti-angiogenen Zusammensetzungen, wie oben beschrieben).

In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Behandeln retrolentaler Fibroplasie, welche den Schritt umfassen Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge eines anti-angiogenen Faktors (oder anti-angiogener Zusammensetzung) zum Auge, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird.

Kurz gesagt ist retrolentale Fibroplasie ein Zustand, der bei Frühgeborenen auftritt, die Sauerstofftherapie erhalten. Die periphere retinale Vaskulatur, insbesondere auf der temporalen Seite wird nicht vollständig bis zum Ende des fötalen Lebens ausgebildet werden. Man glaubt, daß exzessiver Sauerstoff (selbst Spiegel, die im Wortsinn physiologisch wären) und die Bildung von freien Sauerstoffradikalen wichtig ist dafür, die Blutgefäße der unreifen Retina zu schädigen. Diese Gefäße ziehen sich zusammen und werden bei Sauerstoffexposition strukturell obliterieren. Als ein Ergebnis unterbleibt die Vaskularisierung der peripheren Retina und daraus ergibt sich retinale Ischämie. In Reaktion auf die Ischämie wird Neovaskularisierung induziert an der Übergangsstelle der normalen zu ischämischen Retina.

In 75 % der Fälle bilden sich diese Gefäße spontan zurück. In den verbleibenden 25 % jedoch besteht fortgesetzt kapilläres Wachstum, Kontraktion der fibrovaskulären Komponente und Traktion auf beiden Seiten der Gefäße und der Retina. Das führt zu Glaskörperhämorrhagie und/oder retinaler Ablösung, die zu Blindheit führen kann. Neovaskuläres Winkelverschlußglaukom ist auch eine Komplikation dieses Zustands.

Da es oft unmöglich ist zu bestimmen, welche Fälle spontan abheilen werden und welche zur Schwere progressieren werden, wird im allgemeinen herkömmliche Therapie (d.h. Chirurgie) nur bei Patienten begonnen mit etablierter Erkrankung und einer gut entwickelten Pathologie. Dieser "Abwarten und Nachsehen"-Ansatz schließt frühe Intervention aus und erlaubt die Progression der Krankheit in den 25 %, die einem komplizierten Verlauf folgen. Deshalb kann in einer Ausführungsform der Erfindung topische Verabreichung eines anti-angiogenen Faktors (oder anti-angiogener Zusammensetzung, wie oben beschrieben) erreicht werden bei Kleinkindern, die ein hohes Risiko tragen diesen Zustand zu entwickeln in einem Versuch, das Auftreten von Progression retrolentaler Fibroplasie herabzusetzen. In weiteren Ausführungsformen können intravittröse Injektionen und/oder intraokulare Implantate einer anti-angiogenen Zusammensetzung verwendet werden. Solche Verfahren sind besonders bevorzugt in Fällen etablierter Erkrankung, um die Notwendigkeit einer Operation zu verringern.

In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung sind Verfahren vorgesehen zum Behandeln rheumatoider Arthritis, welche den Schritt umfassen Verabreichen einer therapeutisch wirksamen Menge einer anti-angiogenen Zusammensetzung zu einem Gelenk, so daß die Bildung von Blutgefäßen inhibiert wird.

Kurz gesagt beruht der Gelenkschaden bei rheumatoider Arthritis auf einer Kombination von Entzündungen (einschließlich weißer Blutzellen und Produkten von weißen Blutzellen) und Entwicklung von Pannusgewebe (ein Gewebe, das aus neovaskularem Gewebe, Bindegewebe und entzündlichen Zellen zusammengesetzt ist). Allgemein ist chronische Entzündung selbst nicht ausreichend, um dazu zu führen, die Gelenkoberfläche zu beschädigen, aber ein andauernder Mangel wird erzeugt, wenn einmal fibrovaskuläres Gewebe das Knorpelgewebe verdaut.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können anti-angiogene Faktoren (einschließlich anti-angiogener Zusammensetzungen, wie oben beschrieben) verabreicht werden durch intraartikuläre Injektion als eine chirurgische Paste oder als ein orales Agens (z.B. den anti-angiogenen Faktor Thalidomid enthaltend), um die Bildung von Blutgefäßen im Gelenk zu inhibieren. Andere typische Beispiele eines derartigen Verfahrens wird detaillierter unten in Beispiel 19 ausgeführt.

Wie oben festgehalten, sind in einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung Vaskulartransplantate vorgesehen, die eine synthetische Röhre umfassen, deren Oberfläche mit einer anti-angiogenen Zusammensetzung, wie oben beschrieben, umfassen. Kurz gesagt sind Vaskulartransplantate synthetische Röhren, gewöhnlich hergestellt aus Dacron oder Gortex, chirurgisch inseriert, um arterielle Blockaden zu umgehen, am häufigsten von der Aorta zur Femoralarterie oder von der Femoralarterie zur poplitealen Arterie. Ein Hauptproblem, welches besonders femorale-popliteale Bypassstransplantat verkompliziert, ist die Bildung einer subendothelialen narbenähnlichen Reaktion in der Blutgefäßwand, als neointimale Hyperplasie bezeichnet, welche das Lumen im und benachbart zu einem jeden Ende des Transplantates verengt, und das progressiv sein kann. Ein Transplantat, das mit anti-angiogenen Faktoren (oder anti-angiogenen Zusammensetzungen, wie oben beschrieben), beschichtet ist, oder diese enthält, kann verwendet werden, um die Bildung neointimaler Hyperplasie an einem jeden Ende des Transplantates zu beschränken. Das Transplantat kann dann chirurgisch durch herkömmliche Bypass-Techniken plaziert werden.

Anti-angiogene Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch verwendet werden in einer Vielzahl anderer Weisen. Zum Beispiel können sie in chirurgische Nähte eingebaut werden, um Stichgranuloma zu verhindern, in den Uterus implan-

tiert werden (in derselben Weise wie ein IUD) für die Behandlung von Menorrhagie oder als eine Form der Geburtenkontrolle bei der Frau verabreicht werden als entweder eine peritoneale Lavage-Flüssigkeit oder für peritoneale Implantation bei der Behandlung von Endometriose, angehängt werden an einen monoklonalen Antikörper, der gegen aktivierte Endothelialzellen gerichtet ist, als eine Form systemischer Chemotherapie, oder verwendet werden bei diagnostischer Bilddarstellung, wenn an einen radioaktiv markierten monoklonalen Antikörper angehängt, der aktivierte Endothelialzellen erkennt.

Die folgenden Beispiele sind zu Zwecken der Illustration und nicht der Beschränkung angeführt.

#### BEISPIELE

##### BEISPIEL 1

###### HERSTELLUNG EINES ANTI-INVASIVEN FAKTORS

Der Schultergürtel und der Schädel von einem Hundshai wird herausgeschnitten, dann mit einem Skalpell abgeschabt, um alle Muskeln und assoziiertes Bindegewebe vom Knorpel abzuschaben. Der Knorpel wird dann mit einer Gewebemühle homogenisiert und durch kontinuierliches Rühren bei Raumtemperatur für 2 bis 5 Tage in einer Lösung, die 2,0 M Guanidiumhydrochlorid und 0,02 M MES bei pH 6,0 enthält, extrahiert.

Nach 2 bis 5 Tagen wird der Knorpelextrakt durch Gaze gegeben, um die größeren Bestandteile zu entfernen. Das Filtrat wird dann durch eine Amicon-Ultrafiltrationseinheit gegeben, die spiralgewundene Kartuschen, mit einem Molekulargewichtsausschluß von 100.000 verwendet. Das Filtrat (das Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 100.000 Dalton enthält) wird dann gegen 0,02 M MES-Puffer (pH 6) mit einer Amicon-Ul-

trafiltrationseinheit dialysiert, die Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 3.000 Dalton zurückhält. Unter Verwendung dieses Verfahrens werden Proteine und Bestandteile mit geringem Molekulargewicht entfernt, ebenso wie überschüssige Mengen an Guanidium-HCl. Das Dialysat wird konzentriert auf eine Endkonzentration von 9 mg/ml.

## BEISPIEL 2

### ANALYSE VERSCHIEDENER AGENZIEN FÜR ANTI-ANGIOGENE AKTIVITÄT

#### A. Hühnchen-Chorioallantois-Membran ("CAM")-Tests

Befruchtete Embryos von Haushühnchen wurden für 3 Tage vor schalenloser Kultivierung inkubiert. In dieser Prozedur werden die Eihalte geleert, indem die um den Luftraum angeordnete Schale entfernt wurde. Die innere Schalenmembran wurde dann abgetrennt und das gegenüberliegende Ende der Schale perforiert, um zu erlauben, daß die Inhalte des Eis vorsichtig aus dem glattgemachten Ende herausgleiten. Die Eihalte wurden in sterilisierte Glasschüsseln mit Rundboden entleert und mit Petrischalenabdeckungen abgedeckt. Diese wurden dann in einen Inkubator bei 90 % relativer Feuchte und 3 % CO<sub>2</sub> gegeben und für 3 Tage inkubiert.

Taxol (Sigma, St. Louis, MI) wurde gemischt bei Konzentration von 1, 5, 10, 30 µg pro 10 µl Aliquot von 0,5 % wässriger Methylcellulose. Da Taxol in Wasser unlöslich ist, wurden Glas-Kügelchen verwendet, um feine Partikel herzustellen. 10 µl-Aliquots dieser Lösung wurden auf Parafilm für 1 Stunde getrocknet und bildeten Scheiben mit 2 mm Durchmesser. Die getrockneten, Taxol enthaltenden Scheiben wurden dann vorsichtig auf das wachsende Ende von einer jeden CAM am Tage 6 der Inkubation gegeben. Kontrollen wurden erhalten, indem Taxol-freie Methylcellulose-Scheiben auf die CAMs über denselben Zeitver-

lauf plaziert wurden. Nach zweitätiger Exposition (Tag 8 der Inkubation) wurde die Vaskulatur mit Hilfe eines Stereomikroskops untersucht. Liposyn II, eine weiße opake Lösung, wurde in die CAM injiziert, um die Sichtbarkeit der vaskularen Details zu erhöhen. Die Vaskulatur von ungefärbten, lebenden Embryos wurde bildlich dargestellt unter Verwendung eines Stereomikroskops von Zeiss, das an eine Videokamera angeschlossen war (Dage-MTI Inc., Michigan City, IN). Diese Videosignale wurden dann bei 160-facher Vergrößerung gezeigt und unter Verwendung eines Bildanalysesystems (Vidas, Kontron; Etching, Germany) eingefangen. Bildnegative wurden dann auf einem Grafikrekorder erstellt (Modell 3000; Matrix Instruments, Orangeburg, NY).

Die Membranen des 8 Tage alten schalenlosen Embryos wurden mit 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer geflutet; zusätzliches Fixiermittel wurde unter die CAM injiziert. Nach 10 Minuten in situ wurde die CAM entfernt und in frisches Fixiermittel für 2 Stunden bei Raumtemperatur gegeben. Das Gewebe wurde dann über Nacht in Cacodylatpuffer gewaschen, der 6 % Saccharose enthielt. Die interessierenden Regionen wurden nachfixiert in 1 % Osmiumtetroxid für 1,5 Stunden bei 4°C. Die Gewebe wurden dann dehydratisiert in einer abgestuften Serie von Ethanol, Lösungsmittel ausgetauscht mit Propylenoxid und in Spurr-Harz eingebettet. Dünne Schnitte wurden mit einem Diamantmesser geschnitten, plaziert auf Kupfernetzen, gefärbt und in einem Joel 1200EX-Elektronenmikroskop untersucht. In ähnlicher Weise wurden 0,5 mm Schnitte geschnitten und mit Toluenblau für Lichtmikroskopie gefärbt.

Am Tag 11 der Entwicklung wurden Hühnchenembryos für die Korrosionsgießtechnik verwendet. Mercor-Harz (Ted Pella, Inc., Redding, CA) wurde in die CAM-Vaskulatur unter Verwendung einer 30-Gauge-Hypodermalnadel injiziert. Das Gießmaterial bestand aus 2,5 Gramm Mercor CL-2B-Polymer und 0,05 Gramm Kata-

lysator (55 % Benzoylperoxid) mit einer Polymerisationszeit von 5 Minuten. Nach Injektion lies man den Kunststoff in situ für 1 Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht in einem Ofen bei 65°C sich setzen. Die CAM wurde dann in 50 %ige wässrige Lösung von Natriumhydroxid gegeben, um alle organischen Komponenten zu verdauen. Die Kunststoffabgüsse wurden dann extensiv in destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet, mit Gold/Palladium beschichtet und mit dem Philips 501B-Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

Ergebnisse der obigen Experimente sind gezeigt in Fig. 1 bis 4. Kurz gesagt sind die allgemeinen Merkmale der normalen schalenlosen Eikultur von Hühnchen in Fig. 1A gezeigt. An Tag 6 der Inkubation ist der Embryo zentral positioniert gegenüber einem radial expandierenden Netzwerk aus Blutgefäßen; die CAM entwickelt sich benachbart dem Embryo. Diese wachsenden Gefäße liegen nahe der Oberfläche und sind leicht sichtbar, was dieses Ideal zu einem idealisierten Model für das Studium von Angiogenese macht. Lebende, ungefärbte Kapillarnetzwerke der CAM können nicht-invasiv bildlich dargestellt werden mit einem Stereomikroskop. Fig. 1B illustriert solch eine vaskuläre Region, in der die zellulären Blutelemente innerhalb Kapillaren aufgezeichnet wurden unter Verwendung eines Video/Computer-Interface. Die dreidimensionale Architektur derartiger CAM-Kapillarnetzwerke ist gezeigt durch Korrosionsgießverfahren und betrachtet im Rasterelektronenmikroskop (Fig. 1C). Diese Abgüsse enthüllten unterliegende Gefäße, die sich hin zur CAM-Oberfläche erstrecken, wo sie eine einzelne Schicht anastomotischer Kapillaren bilden. Querschnitte durch die CAM zeigen ein äußeres Ektoderm, das aus einer Doppelzellschicht besteht, eine breitere mesodermale Schicht, die Kapillaren enthält, die unter dem Ektoderm liegen, Adventitia-Zellen, und eine innere, einzelne endodermale Zellschicht (Fig. 1D). Auf der Ebene des Elektronenmikroskops werden die typischen strukturellen Details der CAM-Kapillaren gezeigt. Typischerweise liegen diese



Gefäße in enger Assoziation mit der inneren Zellschicht des Ektoderms (Fig. 1E).

Nach 48-stündiger Taxol-Exposition bei Konzentration von 1, 5, 10 oder 30  $\mu\text{g}$  wurde jede CAM unter lebenden Bedingungen mit einem Stereomikroskop untersucht, das mit einem Video/Computerinterface ausgestattet war, um die Wirkungen von Angiogenese zu bewerten. Der Bilddarstellungsaufbau wurde verwendet bei einer 160-fachen Vergrößerung, der die direkte Visualisierung von Blutzellen innerhalb der Kapillaren erlaubte; dadurch konnte Blutstrom in interessierenden Regionen leicht bewertet und aufgezeichnet werden. Für diese Studie wurde Inhibierung von Angiogenese definiert als eine Fläche der CAM, denen es an einem Kapillarnetzwerk mit einem Durchmesser reichend von 2 bis 6 mm fehlte. Inhibierungsregionen mangelte es an vaskularem Blutstrom und wurden nur beobachtet unter experimentellen Bedingungen mit Methylcellulose, die Taxol enthält; unter Kontrollbedingungen mit Scheiben, denen Taxol fehlte, wurde keine Wirkung auf das sich entwickelnde Kapillarsystem beobachtet. Die Dosis-abhängigen, experimentellen Daten der Wirkungen von Taxol bei verschiedenen Konzentrationen werden in Tabelle II gezeigt.

TABELLE II

<u>Angiogene Inhibierung durch Taxol</u>		
Taxol-Konzentration $\mu\text{g}$	Bewertete Embryonen (positiv/insgesamt)	% Inhibition
30	31/31	100
10	16/21	76
5	18/25	72
1	6/15	40
Kontrolle	0/30	0

Typische Taxol-behandelte CAMs (Fig. 2A und 2B) werden gezeigt, wobei die transparente Methylcellulosescheibe zentral

über der avaskulären Zone, die einen Durchmesser von 6 mm mißt, positioniert ist. Bei geringfügig höherer Vergrößerung ist die Peripherie derartiger avaskulärer Zonen klar ersichtlich (Fig. 2C); die umgebenden funktionalen Gefäße wurden oft weggeleitet von der Taxolquelle (Fig. 2C und 2D). Solch winkeliges Umleiten von Blutstrom wurde nie unter normalen Bedingungen beobachtet. Ein weiteres Merkmal der Taxolwirkungen war die Bildung von Blutinseln innerhalb der avaskulären Zone, die die Aggregation von Blutzellen darstellte.

Die assoziierten morphologischen Änderungen der Taxol-behandelten CAM sind leicht zu erkennen sowohl auf der Licht- als auch der elektronenmikroskopischen Ebene. Für eine bequeme Darstellung sind drei distinkte Phasen eines allgemeinen Überganges vom normalen zum avaskulären Zustand gezeigt. Nahe der Peripherie der avaskulären Zone ist die CAM gekennzeichnet durch eine Reichhaltigkeit an mitotischen Zellen innerhalb aller drei Keimschichten (Fig. 3A und 4A). Diese verstärkte mitotische Teilung war auch eine konsistente Beobachtung für kapillare endotheliale Zellen. Die endothelialen Zellen verblieben jedoch verbindungs-mäßig intakt mit keiner Extravasation von Blutzellen. Mit weiterem Abbau ist die CAM gekennzeichnet durch den Zusammenbruch und Auflösung von Kapillaren (Fig. 3B und 4B). Die mutmaßlichen endothelialen Zellen, typischerweise in Mitosis verharret, behalten noch eine enge räumliche Beziehung mit Blutzellen bei und liegen unterhalb des Ektoderms; diese Zellen sind jedoch nicht funktional verbunden. Der zentralste Anteil der avaskulären Zone war gekennzeichnet durch eine verdickte ektodermale und endodermale Schicht (Fig. 3C und 4C). Obwohl diese Schichten verdickt waren, blieben die zellulären Junctionen intakt und die Schichten behielten ihre strukturellen Eigenschaften bei. Innerhalb des Mesoderms waren verteilte mitotisch arretierte Zellen reichlich vorhanden; diese Zellen wiesen nicht die Endothelialzellenpolarisation auf, die in der früheren Phase beobachtet

wurde. Auch waren innerhalb dieser avaskulären Region degenerierende Zellen verbreitet, wie festgestellt durch die elektronendichten Vakuolen und Zelldebris (Fig. 4C).

Zusammengefaßt zeigte diese Studie, daß 48 Stunden nach Taxolapplikation zu der CAM Angiogenese inhibiert war. Die Blutgefäßinhibition bildete eine avaskuläre Zone, die durch drei Übergangsphasen der Taxolwirkung dargestellt wurde. Die zentrale, am meisten betroffene Region der avaskulären Zone enthielt zerrissene Kapillaren mit in das Gewebe ausgetretenen roten Blutzellen; dies zeigte an, daß die intrazellulären Junctionen zwischen Endothelzellen absent waren. Zellen des Endoderms und Ektoderms behielten ihre intrazellulären Junctionen und demzufolge blieben diese Keimschichten intakt; sie waren jedoch leicht verdickt. Als man sich der normalen vaskulären Region näherte, behielten die Blutgefäße ihre junctionalen Komplexe bei und blieben somit auch intakt. An der Peripherie der Taxol-behandelten Zone war weiteres Blutgefäßwachstum inhibiert, was evident war durch das typische Umleiten oder "Ellenbogen"-Effekt der Blutgefäße (Fig. 2D).

Taxol-behandelte avaskuläre Zonen enthielten auch eine Vielzahl an Zellen, die in der Mitose arretiert waren, in allen drei Schichten der CAM; dies war einzigartig für Taxol, da keine vorhergehenden Studien ein derartiges Ereignis gezeigt hatte. Indem sie in Mitosis arretiert waren, konnten die Endothelzellen nicht ihre normalen metabolischen Funktionen, die in Angiogenese involviert sind, durchmachen. Im Vergleich produziert die avaskuläre Zone, die durch Suramin und Cortisonacetat gebildet wird, keine mitotisch arretierten Zellen in der CAM; sie verhinderten nur weiteres Blutgefäßwachstum in die behandelte Region. Deshalb sind, obwohl selbst Agenzien antiangiogen sind, viele Punkte vorhanden, in denen der Angiogenese-prozeß targetiert werden kann.

Wir beobachteten auch die Wirkungen von Taxol über die Dauer von 48 Stunden und beobachteten, daß Inhibierung von Angiogenese so früh erfolgt wie 8 Stunden nach der Anwendung. Histologische Schnitte enthüllten eine ähnliche Morphologie, wie gesehen in der ersten Übergangsphase der avaskulären Zone bei 48 Stunden, illustriert in Fig. 3a und 4a. Auch beobachteten wir den Revaskularisationsprozeß in die avaskuläre Zone, wie oben beobachtet. Man hat gefunden, daß die durch Heparin und angiostatische Steroide gebildete avaskuläre Zone 60 Stunden nach Applikation revaskularisiert wird. In unserer Studien revaskularisierten die Taxol-behandelten avaskulären Zonen für mindestens 7 Tage nach Applikation nicht, was eine potentere Langzeitwirkung impliziert.

### BEISPIEL 3

#### ENKAPSULIERUNG VON SURAMIN

Ein Milliliter 5 % ELVAX (Poly(Ethylen-Vinylacetat) quervernetzt mit 5 % Vinylacetat) in Dichlormethan ("DCM") wird gemischt mit einem festen Gewicht submikron-gemahlenem Natriumsuramin. Diese Mischung wird in 5 ml 5 % Polyvinylalkohol ("PVA") in Wasser in ein 30 ml Teströhrchen mit flachem Boden injiziert. Röhrchen, die verschiedene Gewichte des Wirkstoffes enthalten, werden dann in einem Vielfachprobenwasserbad bei 40°C für 90 Minuten mit automatisierten Rühren suspendiert. Die Mischungen werden entfernt und Mikrosphärenproben für eine Größenanalyse entnommen. Die Röhrchen werden zentrifugiert bei 1000 g für 5 Minuten. Der PVA-Überstand wird entfernt und für die Analyse (nicht-enkapsulierter Wirkstoff) aufgehoben. Die Mikrosphären werden dann gewaschen (gevortexed) in 5 ml Wasser und rezentrifugiert. Die 5 ml Waschlösung wird zu Analysezwecken aufgehoben (Oberflächen-gebundener Wirkstoff). Die Mikrosphären werden dann in 50 µl Methanol angefeuchtet und in 1 ml DCM gevortexed, um das ELVAX aufzulösen. Die Mikrosphären

werden dann auf 40°C erwärmt und 5 ml Wasser bei 50°C werden langsam unter Rühren zugegeben. Diese Prozedur führt zur unmittelbaren Verdampfung von DCM und verursacht dadurch die Freisetzung von Natriumsuramin in die 5 ml Wasser. Alle drei 5 ml Proben wurden dann auf Wirkstoffgehalt getestet.

Natriumsuramin absorbiert UV/VIS mit einem Lambda-Max von 312 nm. Die Absorption ist linear im Bereich von 0 bis 100 µg/ml sowohl in Wasser als auch in 5 % PVA. Der Wirkstoff fluoresziert stark mit einem Exzitationsmaximum bei 312 nm und Emissionsmaximum bei 400 nm. Die Fluoreszenz ist quantifizierbar im Bereich 0 bis 25 µg/ml.

Ergebnisse sind in Fig. 5 bis 10 gezeigt. Kurz gesagt scheint die Größenverteilung der Mikrosphären von Einschluß des Wirkstoffes im DCM nicht beeinflußt zu sein (siehe Fig. 5 und 6). Gute Ausbeuten an Mikrosphären im Bereich von 20 bis 60 µm können erhalten werden.

Die Einkapsulierung von Suramin ist sehr gering (< 1 %) (siehe Fig. 8). Wenn jedoch das Gewicht des Wirkstoffs im DCM erhöht wird, erhöhte sich die Gesamtmenge des enkapsulierten Wirkstoffes, obwohl die % Verkapselung abnahm. Wie in Fig. 7 gezeigt, können 50 µg des Wirkstoffes in 50 ml ELVAX enkapsuliert werden. Einkapsulierung von Natriumsuramin in 5 % PVA, der 10 % NaCl enthält, ist in Fig. 9 bis 10 gezeigt.

#### BEISPIEL 4

##### VERKAPSELUNG VON TAXOL

Fünfhundert Mikrogramm von entweder Taxol oder Baccatin (ein Taxol-Analog, erhältlich von Inflazyme Pharmaceuticals Inc., Vancouver, British Columbia, Canada werden in 1 ml einer 50:50 ELVAX:Poly-l-Milchsäure-Mischung in DCM gelöst. Mikrosphären

werden dann in einer Lösungsmaschine (sechsspindeliger Auflösungstester, Vanderkamp, Van Kell Industries Inc., U.S.A.) dreifach bei 200 Umdrehungen pro Minute, 42°C, für 3 Stunden hergestellt. So hergestellte Mikrosphären werden zweifach in Wasser gewaschen und am Mikroskop nach Größe geordnet.

Bestimmung von Taxolverkapselung wird vorgenommen in einem UV/VIS-Test (UV/VIS Lambda max. bei 237 nm, Fluoreszenztest bei Exzitation 237, Emission bei 325 nm; Fluoreszenzergebnisse sind in eckigen Klammern [] dargestellt). Bei Verwendung der oben beschriebenen Prozeduren, können 58 µg (+/- 12 µg) [75 µg (+/- 25 µg)] Taxol ausgehend von insgesamt 500 µg Ausgangsmaterial enkapsuliert (verkapselt) werden. Dies stellt 12 % (+/- 2,4 %) [15 % (+/- 5 %)] des ursprünglichen Gewichts, oder 1,2 Gew.-% (+/- 0,25 Gew.-%) [1,5 Gew.-% (+/- 0,5 Gew.-%)] des Polymers dar. Nach 18-stündigem Taumeln in einem Ofen bei 37°C waren 10,3 % (+/- 10 %) [6 % (+/- 5,6 %)] des gesamten Taxols von den Mikrosphären freigesetzt worden.

Für Baccatin können 100 +/- 15 µg [83 +/- 23 µg] Baccatin von insgesamt 500 µg Ausgangsmaterial enkapsuliert werden. Dies stellt 20 % (+/- 3 %) [17 % (+/- 5 %)] des ursprünglichen Gewichts von Baccatin und 2 Gew.-% (+/- 0,3 Gew.-%) [1,7 Gew.-% (+/- 0,5 Gew.-%)] des Polymers dar. Nach 18 stündigem Taumeln in einem Ofen bei 37°C, sind 55 % (+/- 13 %) [60 % (+/- 23 %)] des Baccatins von den Mikrosphären freigesetzt.

#### BEISPIEL 5

#### ANALYSE VON CHIRURGISCHER PASTE, DIE ANTI-ANGIOGENE ZUSAMMENSETZUNGEN ENTHÄLT

Fisher-Ratten mit einem Gewicht von etwa 300 g werden betäubt und eine 1 cm lange transversale Inzision am oberen Abdomen wird vorgenommen. Zwei Zehntel eines Milliliters Saline, der 1

$\times 10^6$  lebende 9L-Gliosarkom-Zellen (unmittelbar eluiert vor Verwendung aus Gewebekultur) enthält, werden in 2 der 5 hepatischen Loben injiziert durch Einstechen einer 27-Gauge-Nadel 1 cm durch die Leberkapsel. Die abdominale Wunde wird mit 6 mm resorbierbarem Faden und Hautklammern geschlossen und die GA beendet.

Nach 2 Wochen werden die Tumorhinterlegungen etwa 1 cm messen. Zu diesem Zeitpunkt werden beide hepatischen Tumoren herausgeschnitten und der bare Rand der Leber wird mit einem hämostatischen Agens bepackt. Die Ratten werden in zwei Gruppen eingeteilt: der Hälfte wird ein Polymerträger alleine verabreicht, und die andere Hälfte erhält eine anti-angiogenen Zusammensetzung.

Die Ratten werden 2, 7, 14, 21 und 84 Tage nach hepatischer Resektion getötet. Insbesondere werden die Ratten getötet durch Injektion von Euthanyl in die Dorsalvene des Schwanzes. Die Leber, Milz und beide Lungen werden entfernt und eine histologische Analyse durchgeführt, um die Tumoren hinsichtlich eines Ergebnisses anti-angiogener Aktivität zu studieren.

#### BEISPIEL 6

##### EMBOLISIERUNG VON RATTENARTERIEN

Fisher-Ratten mit einem Gewicht von etwa 300 g werden betäubt. Unter Verwendung aseptischer Prozeduren wird eine 1 cm lange transversale Inzision am oberen Abdomen vorgenommen und die Leber identifiziert. Zwei Zehntelmilliliter Saline, die 1 Million lebende 9L-Gliosarkom-Zellen enthält (unmittelbar vorher von Gewebekulturen eluiert), wird in jeden der 5 hepatischen Loben injiziert durch Durchstechen einer 27 Gauge-Nadel 1 cm durch die Leberkapsel. Ein Zehntelmilliliter normaler Saline wird in die Nadel injiziert, wenn sie zurückgezogen wird, um

sicherzustellen, daß kein zufälliges Austreten von Zellen in die Peritonealhöhle erfolgt. Ein Gelschaumtupfer wird an jeder Punktierungsstelle plaziert, um Hämostase zu gewährleisten. Die Abdominalwunde wird mit 6.0 resorbierbarem Faden mit Hautklammern verschlossen und die Betäubung beendet. Die Ratte wird zur Tierstation zurückgegeben und erhält eine Standardernährung für 14 Tagen, wobei zu der Zeit jede Tumorphinterlegung 1 cm mißt. Dasselbe Verfahren wird wiederholt unter Verwendung von Westar-Ratten und einer Colon-Krebszelllinie (Radiologic Oncology Lab, M.D. Anderson, Houston, Texas). In diesem Falle bedarf es 3 Wochen nach der Injektion, bis die Tumorphinterlegungen jeweils einen Durchmesser von 1 cm aufweisen.

Nach 2 oder 3 Wochen, abhängig von der Rattenspezies, wird dieselbe anästhetische Prozedur vorgenommen und eine Mittellinienabdominalinzision wird vorgenommen. Das Duodenum wird umgedreht und die Gastroduodenalarterie wird identifiziert und mobilisiert. Bänder werden oberhalb und unterhalb einer Durchschneidestelle auf dem mittleren Teil der gastroduodenalen Arterie (GDA) plaziert und ein 0,038 Inch Polyethylenschlauch wird retrograd in die Arterie eingeführt unter Verwendung eines in Betrieb befindlichen Mikroskops. Das Band unterhalb des Insertionspunktes wird die Arterie unterbinden, während das obere den Katheter vor Ort fixieren wird. Angiographie wird vorgenommen durch Injektion von 0,5 ml 60 % radiopaken Kontrastmaterials durch den Katheter, wenn eine Röntgenaufnahme gemacht wird. Die hepatische Arterie wird dann embolisiert durch Refluxieren von Partikeln mit einer Größe von 15 bis 200  $\mu\text{m}$  durch den Gastroduodenalarterienkatheter, bis man sieht, daß der Strom, beobachtet mittels des in Betrieb befindlichen Mikroskops, für mindestens 30 Sekunden aufhört. Okklusion der hepatischen Arterie wird bestätigt durch Wiederholen eines Angiogramms durch den GDA-Katheter. Unter Verwendung dieser Prozedur erhalten die Hälfte der Ratten 15 bis 200  $\mu\text{m}$  Partikel aus Polymer allein und die andere Hälfte erhält 15 bis 200  $\mu\text{m}$



Partikel der Polymer-Anti-Angiogenfaktor-Zusammensetzung. Die obere GDA-Ligatur wird entfernt, um die GDA zu okkludieren, wenn der Katheter zurückgezogen wird, um Hämostase zu gewährleisten, und die hepatische Arterie (obwohl embolisiert) wird intakt belassen. Das Abdomen wird dann mit 6,0 resorbierbarem Faden und chirurgischen Klammern verschlossen.

Die Ratten wurden nachfolgend 2, 7, 14, 21 und 84 Tage nach der Embolisierung getötet, um Wirksamkeit des anti-angiogenen Faktors zu bestimmen. Kurz gesagt liegt allgemeine Anästhesie vor und unter Verwendung aseptischer Vorsichtsmaßnahmen wird eine Mittellinieninzision vorgenommen. Die GDA ist wieder mobilisiert und nach Platzieren einer Ligatur nahe der Junktion der GDA und der Leberarterie (d.h. gut oberhalb der Stelle des vorherigen Schnitts), wird ein 0,038 Inch Polyethylenschlauch mittels Durchschneidens des Gefäßes inseriert und Angiographie vorgenommen. Die Ratte wird dann durch Injektion von Euthanyl in die Dorsalvene des Schwanzes getötet. Nachdem Euthanasierung bestätigt ist, wird die Leber im Block zusammen mit dem Magen, Milz und beiden Lungen entfernt.

Die histologische Analyse wird vorgenommen auf einem präparierten Träger, der mit Hämatoxylin und Eosin ("H und E")-Färbung gefärbt ist. Kurz gesagt werden die Lungen in 1 cm Intervallen geschnitten, um Passage embolischen Materials durch die hepatischen Venen und in die rechte Seite der Blutzirkulation zu bewirken. Der Magen und die Milz werden auch geschnitten, um unabsichtliche Immobilisierung von Partikelreflux in den Abdominalzugang der kollateralen Zirkulation zu bewerten.

#### BEISPIEL 7

##### TRANSPLANTATION VON GALLENENDOPROTHESEN IN RATTEN

Allgemeines Anästhetikum wird 300 g schweren Fisher-Ratten

verabreicht. Eine 1 cm transversale Inzision wird dann im oberen Abdomen vorgenommen und die Leber identifiziert. In den oberflächlichsten Lobus werden 0,2 ml Saline, die 1 Million Zellen 9L-Gliosarkomzellen enthält (eluiert von Gewebekultur unmittelbar vor Verwendung) mittels einer 27-Gauge-Nadel in einer Tiefe von 1 cm in die Leberkapsel injiziert. Hämostase wird erreicht nach Entfernen der Nadel durch Plazieren eines Gelschaumtupfers an den Punktierungsstellen. Saline wird injiziert, wenn die Nadel entfernt wird, um sicherzustellen, daß kein Austreten von Zellen in die Peritonealhöhle oder entlang der Nadelspur erfolgt. Die allgemeine Betäubung wird beendet und das Tier zur Tierstation zurückgegeben und auf eine normale Diät gesetzt.

Zwei Wochen später wird eine allgemeine Anästhesie verabreicht und unter Verwendung aseptischer Maßnahmen wird der Leberlappen, der den Tumor enthält, durch eine Mittellinieninzision identifiziert. Eine 16-Gauge-Angiographie-Nadel wird dann durch die Leberkapsel in den Tumor eingeführt, ein 0,038 Inch Führungsdraht durch die Nadel geführt und die Nadel über dem Führungsdraht zurückgezogen. Ein French-Dilator Nr. 5 wird durch die Führung in den Tumor eingebracht und zurückgezogen. Ein French-Absetzkatheter Nr. 5 wird dann über den Draht geführt, der einen selbstexpandierende Wallstent aus rostfreiem Stahl (Durchmesser 5 mm und 1 cm lang) enthält. Die Endoprothese wird in den Tumor abgesetzt und der Führungsdraht-Freisetzungskatheter wird entfernt. Einem Drittel der Ratten wurde eine herkömmliche Endoprothese aus rostfreiem Stahl in den Tumor inseriert, einem Drittel eine Endoprothese aus rostfreiem Stahl, die mit Polymer beschichtet war, und einem Drittel eine Endoprothese, die mit der Polymer-anti-angiogenen Faktor-Verbindung beschichtet war. Die allgemeine Anästhesie wird beendet und die Ratten zur Tierstation zurückgegeben.

Eine einfache Röntgenaufnahme des Abdomens wird am zweiten Tag

vorgenommen, um den Umfang des Öffnens der Endoprothese zu bestimmen. Die Ratten werden 2, 7, 14, 28 und 56 Tage nach Insertion der Endoprothese durch Injektion von Euthanyl getötet und ihre Lebern en bloc entfernt, nachdem die Tötung bestätigt ist. Nach Fixierung in Formaldehyd für 48 Stunden wird die Leber in 0,5 mm Abständen geschnitten; einschließlich transversalem Durchtrennen der Endoprothese unter Verwendung einer neuen Klinge für jede Scheibe. Histologische Schnitte, gefärbt mit H und E, werden dann analysiert, um den Umfang von Tumoreinwachstum in das Lumen der Endoprothese zu bewerten.

#### BEISPIEL 8

##### HERSTELLUNG VON MIKROSPHÄREN

Die Ausrüstung, die für die Herstellung von unten beschriebenen Mikrosphären bevorzugt wird, schließt ein: 200 ml Becher mit Wassermantel (Kimax oder Pyrex), Zirkulationswasserbad von Haake, Überkopfrührer und Kontrolleinheit mit einem Durchmesser von 2 Inch (4 Blätter, Rührer aus rostfreiem Stahl vom Propellertyp - Marke Fisher), 500 ml Glasbecher, Heizplatte/-Rührer (Marke Corning), 4 x 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen (Nalgene), Glasszintillationsröhrchen mit Kunststoffinsertionskappen, Tischzentrifuge (GPR Beckman), Hochgeschwindigkeitszentrifuge - Bodenmodell (JS 21 Beckman), analytische Waage von Mettler (AJ 100, 0,1 mg), digitale Waage mit Oberbelastung von Mettler (AE 163, 0,01 mg), automatische Pipetten (Gilson). Reagenzien schließen ein Polycaprolacton ("PCL"-Molekulargewicht 10.000 bis 20.000; Polysciences, Warrington Pennsylvania, USA), "gewaschenes" Ethylenvinylacetat ("EVA", gewaschen um das Anti-Oxidans BHT zu entfernen), Poly-(DL)Milchsäure ("PLA" - Molekulargewicht 15.000 bis 25.000; Polysciences), Polyvinylalkohol ("PVA"-Molekulargewicht 124.000 bis 186.000; 99 % hydrolysiert; Aldrich Chemical Co., Milwaukee WI, USA), Dichlormethan ("DCM" oder "Methylenchlo-

rid"; HPLC-Grad Fisher Scientific); und destilliertes Wasser.

A. Herstellung von 5 % (w/v) Polymerlösungen

Abhängig von der herzustellenden Polymerlösung wird 1,0 g PCL oder PLA, oder je 0,5 g PLA und gewaschenes EVA direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen eingewogen. 20 ml DCM werden dann zugegeben und das Röhrchen fest verschlossen. Das Röhrchen wird bei Raumtemperatur (25°C) für 1 Stunde (gelegentliches Schütteln kann verwendet werden) oder bis das ganze Polymer sich aufgelöst hat (die Lösung sollte klar sein) gelagert. Die Lösung kann bei Raumtemperatur für mindestens zwei Wochen gelagert werden.

B. Herstellung von 5 % (w/v) Stammlösung von PVA

Fünfundzwanzig Gramm PVA werden direkt in einen 600 ml Glasbecher eingewogen. 500 ml destillierten Wassers werden zugegeben, zusammen mit einem Teflon beschichteten Rührfisch mit 3 Inch. Der Becher wird mit Glas abgedeckt, um Verdampfungsverluste zu verringern und in einen 2.000 ml Glasbecher gegeben, der 300 ml Wasser enthält (das als Wasserbad wirkt). Das PVA wird bei 300 Upm bei 85°C (Heizplatte/Rührer von Corning) für 2 Stunden gerührt, oder bis es vollständig gelöst ist. Lösung des PVA kann bestimmt werden durch visuelle Kontrolle; die Lösung sollte klar sein. Die Lösung wird dann in einen Glasvorratsbehälter mit Schraubdeckel überführt und bei 4°C für maximal zwei Monate gelagert. Die Lösung sollte jedoch vor Verwendung oder Verdünnung auf Raumtemperatur erwärmt werden.

C. Prozedur zum Herstellen von Mikrosphären

Auf der Basis der Größe der Mikrosphären, die hergestellt wer-

den sollen (siehe Tabelle 1), werden 100 ml der PVA-Lösung (Konzentrationen in Tabelle III angegeben) in den 200 ml Becher mit Temperiermantel gegeben. Das Zirkulationswasserbad von Haake ist mit diesem Becher verbunden und man erlaubt den Inhalten, daß sie bei 27°C (+/- 10°C) für 10 Minuten äquilibrieren. Auf der Basis der Größe der herzustellenden Mikrosphären (siehe Tabelle III) wird die Startgeschwindigkeit des Kopfrührers eingestellt und das Blatt des Kopfrührers hälftig in der PVA-Lösung plaziert. Der Rührer wird dann angeschaltet und 10 ml Polymerlösung (Polymerlösung, die verwendet wird auf der Basis des Typs der herzustellenden Mikrosphären) werden dann in das gerührte PVA über eine Zeitspanne von 2 Minuten getropft unter Verwendung einer automatischen 5 mm Pipette. Nach 3 Minuten wird die Rührgeschwindigkeit angepaßt (siehe Tabelle III) und die Lösung für weitere 2,5 Stunden gerührt. Das Rührblatt wird dann aus dem Mikrosphärenpräparat entfernt und mit 10 ml destilliertem Wasser abgewaschen, so daß die Abwaschlösung in das Mikrosphärenpräparat abfließt. Das Mikrosphärenpräparat wird dann in einen 500 ml Becher geschüttet und das Wasserbad mit Wassermantel mit 70 ml destilliertem Wasser gewaschen, dem man auch erlaubt, in das Mikrosphärenpräparat abzulaufen. Das Mikrosphärenpräparat von 180 ml wird dann mit einem Glasstab gerührt und gleiche Mengen werden in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen gegossen. Die Röhrchen werden dann verschlossen und für 10 Minuten zentrifugiert (Kräfte angegeben in Tabelle 1). Eine automatische 5 ml Pipette oder Vakuumabsaugen wird dann verwendet, um 45 ml der PVA-Lösung von jedem Mikrosphärenpellett abzuziehen.

TABELLE III

PVA-Konzentrationen, Rührgeschwindigkeiten und  
Erfordernisse hinsichtlich der Zentrifugalkraft  
für jeden Durchmesserbereich von Mikrosphären

Produktionsstufe	Mikrosphärendurchmesserbereich		
	30 $\mu\text{m}$ bis 100 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$ bis 30 $\mu\text{m}$	0,1 $\mu\text{m}$ bis 3 $\mu\text{m}$
PVA-Konzentration	2,5 % (w/v) (d.h. verdünne 5 % Stammlösung mit destillier- tem Wasser)	5 % (w/v) (d.h. unverdünnte Stammlösung)	3,5 % (w/v) (d.h. verdünne 5 % Stammlösung mit destil- liertem Wasser)
Rührergeschwindig- keit zu Beginn	500 Upm +/- 50 Upm	500 Upm +/- 50 Upm	3000 Upm +/- 200 Upm
Angepaßte Rührer- geschwindigkeit	500 Upm +/- 50 Upm	500 Upm +/- 50 Upm	2500 Upm +/- 200 Upm
Zentrifugenkraft	1000 g +/- 100 g (Tischmodell)	1000 g +/- 100 g (Tischmodell)	10.000 g +/- 1000 g (Hochge- schwindig- keitsmodell)

5 ml destillierten Wassers werden dann zu jedem Zentrifugenröhrchen zugegeben, das dann gewirbelt wird, um die Mikrosphären zu resuspendieren. Die vier Mikrosphärensuspensionen werden dann in ein Zentrifugenröhrchen zusammen mit 20 ml destilliertem Wasser vereinigt und für weitere 10 Minuten zentrifugiert (Kraft angegeben in Tabelle 1). Dieser Prozeß wird zwei zusätzliche Male wiederholt für insgesamt drei Waschungen. Die Mikrosphären werden dann ein letztes Mal zentrifugiert und in 10 ml destilliertem Wasser resuspendiert. Nach dem letztendlichen Waschen wird das Mikrosphärenpräparat in ein vorab gewogenes Glasszintillationsröhrchen überführt. Das Röhrchen wird verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur (25°C) belassen, um den Mikrosphären zu erlauben, unter Schwerkraft zu se-

dimentieren. Mikrosphären, die in den Größenbereich von  $0,1\ \mu\text{m}$  bis  $3\ \mu\text{m}$  fallen, sedimentieren unter Schwerkraft nicht aus, so daß sie in der 10 ml Suspension verbleiben.

D. Trocknen von Mikrosphären mit  $10\ \mu\text{m}$  bis  $30\ \mu\text{m}$  oder  $30\ \mu\text{m}$  bis  $100\ \mu\text{m}$

Nachdem sich die Mikrosphären über Nacht bei Raumtemperatur abgesetzt haben, wird eine automatische 5 ml Pipette oder Vakuumabsauger verwendet, um den Überstand von den sedimentierten Mikrosphären abzusaugen. Man erlaubt den Mikrosphären, in dem nicht mit einem Deckel versehenen Röhrchen in einem Abzug über einen Zeitraum von einer Woche zu trocknen oder bis sie vollständig getrocknet sind (Röhrchen bei konstantem Gewicht). Schnelleres Trocknen kann erreicht werden, indem die nicht verschlossenen Röhrchen unter einem langsamen Stickstoffgasstrom im Abzug belassen werden (Strom etwa  $10\ \text{ml/min.}$ ). Wenn es vollständig trocken ist (Röhrchen bei konstantem Gewicht), wird das Röhrchen gewogen und verschlossen. Das markierte, verschlossene Röhrchen wird in einer Schublade bei Raumtemperatur gelagert. Mikrosphären werden normalerweise nicht länger als 3 Monate gelagert.

E. Trocknen von Mikrosphären mit  $0,1\ \mu\text{m}$  bis  $3\ \mu\text{m}$  Durchmesser

Dieser Größenbereich von Mikrosphären wird nicht aussedimentieren, so daß sie in Suspension bei  $4^\circ\text{C}$  für maximal vier Wochen belassen werden. Um die Konzentration an Mikrosphären in der 10 ml Suspension zu bestimmen, wird eine  $200\ \mu\text{l}$  Probe der Suspension in ein vorab gewogenes  $1,5\ \text{ml}$  Mikrofugenröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird dann bei  $10.000\ \text{g}$  zentrifugiert (Eppendorf-Tisch-Mikrofuge), der Überstand entfernt, und man erlaubt dem Röhrchen, bei  $50^\circ\text{C}$  über Nacht zu trocknen. Das Röhrchen wird dann erneut gewogen, um das Gewicht getrockneter Mikrosphären im Röhrchen zu bestimmen.

F. Herstellung von Taxol-beladenen Mikrosphären

Um Taxol-enthaltende Mikrosphären herzustellen, wird eine geeignete Menge gewogenen Taxols (auf der Basis des Prozentsatzes an Taxol, der enkapsuliert werden soll) direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen gegeben. 10 ml einer geeigneten Polymerlösung werden dann zu dem Röhrchen gegeben, das Taxol enthält, das dann gewirbelt wird, bis das Taxol aufgelöst ist.

Mikrosphären, die Taxol enthalten, können hergestellt werden im wesentlichen, wie oben in Schritten (C) bis (E) beschrieben.

BEISPIEL 9

HERSTELLUNG VON ENDOPROTHESEN BESCHICHTUNG

Reagenzien und Ausrüstung, die verwendet werden in den folgenden Experimenten schließen ein (Endoprothesen der medizinischen Art, die kommerziell von einer Vielzahl von Herstellern erhalten werden; z.B. die "Strecker"-Endoprothese) und Haltevorrichtung, 20 ml Glassszintillationsröhrchen mit Kappe (Kunststoffinsertionstyp), TLC-Sprüher, Stickstoffgastank, Glasteströhrchen (verschiedene Größen von 1 ml und größer), Glasbecher (verschiedene Größen), Pasteur-Pipette, Pinzette, Polycaprolacton ("PCL" - Molekulargewicht 10.000 bis 20.000; Polysciences), Taxol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., Reinheit 95 %), Ethylenvinylacetat ("EVA" - gewaschen, siehe oben), Poly(DL)Milchsäure ("PLA" - Molekulargewicht 15.000 bis 25.000; Polysciences), Dichlormethan ("DCM" - HPLC-Grad, Fisher Scientific).

A. Verfahren für besprühte Endoprothesen

Im folgenden wird ein typisches Verfahren beschrieben, das



eine 3 mm als Schichten eingelagerte Metalledrahtendoprothese mit gekräuselter Durchmesser von etwa 3 cm Länge verwendet. Für Endoprothesen mit größerem Durchmesser werden größere Volumen an Polymer/Wirkstofflösung verwendet.

Wiege ausreichend Polymer direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen ein und füge ausreichend DCM hinzu, um eine 2 % w/v-Lösung zu erhalten. Verschließe das Röhrchen und mische die Lösung, um das Polymer zu lösen (Handschütteln). Baue die Endoprothese in einer vertikalen Orientierung zusammen. Das kann erreicht werden unter Verwendung eines Nylonstückes und Anbinden der Endoprothese an ein Stativ. Positioniere diese Endoprothesenhalteapparatur 6 bis 12 Inch über dem Abzugsboden auf einem geeigneten Träger (z.B. umgedrehter 2.000 ml Glasbecher), um horizontales Besprühen zu erlauben. Transferiere ein geeignetes Volumen (Minimum 5 ml) unter Verwendung einer automatischen Pipette der 2 % Polymerlösung in ein getrenntes 20 ml Glasszintillationsröhrchen. Füge eine geeignete Menge Taxol der Lösung zu und löse es durch Handschütteln des verschlossenen Röhrchens.

Um für das Besprühen vorzubereiten, entferne den Deckel des Röhrchens und tauche (nur) das Spritzgehäuse eines TLC-Zerstäubers in die Polymerlösung. Beachte, daß das Reservoir des Zerstäubers in dieser Prozedur nicht verwendet zu werden braucht: das 20 ml Glasröhrchen dient als Reservoir. Verbinde den Stickstofftank mit dem Gaseinlaß des Zerstäubers. Erhöhe graduell den Druck bis Zerstäuben und Sprühen beginnt. Notiere den Druck und verwende diesen Druck während der Prozedur. Um die Endoprothese zu besprühen, verwende 5 Sekunden oszillierende Sprühvorgänge mit einer Trockenzeit von 15 Sekunden zwischen den Sprühvorgängen. Rotiere die Endoprothese um 90° nach 5 Sprühdurchgängen und besprühe jenen Teil der Endoprothese. Wiederhole dies, bis alle Seiten der Endoprothese besprüht worden sind. Während der Trockenzeit störe die Gaslinie mit

dem Finger, um Verschwendung des Sprays zu vermeiden. Das Besprühen wird fortgesetzt, bis eine geeignete Menge Polymers auf den Endoprothesen abgelagert ist. Die Menge kann basieren auf der spezifischen Endoprothesenanwendung *in vivo*. Um die Menge zu bestimmen, wiege die Endoprothese nachdem das Besprühen abgeschlossen worden ist und die Endoprothese getrocknet hat. Ziehe das Ausgangsgewicht der Endoprothese vom Endgewicht ab und das liefert die Menge an Polymer (plus Taxol), die auf die Endoprothese aufgetragen ist. Lagere die beschichtete Endoprothese in einem versiegelten Behälter.

#### B. Verfahren für Tauchendoprothesen

Im folgenden wird ein typisches Verfahren beschrieben, das eine 3 mm als Schichten eingelagerte Metalldrahtendoprothese mit gekräuselter Durchmesser von etwa 3 cm Länge verwendet. Für Endoprothesen mit größerem Durchmesser werden größere Volumina an Polymer/Wirkstofflösung in größeren Teströhrchen verwendet.

Wiege 2 g EVA in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen und setze 20 ml DCM zu. Verschließe das Röhrchen und lasse es für 2 Stunden stehen, um zu lösen (schüttle das Röhrchen häufig mit der Hand, um den Auflösungsprozeß zu unterstützen). Wiege eine bekannte Menge Taxol direkt in ein 1 ml Glastestströhrchen ein und setze 0,5 ml Polymerlösung zu. Löse das Taxol unter Verwendung einer Pasteurpipette aus Glas durch vorsichtiges Pumpen der Polymerlösung. Nachdem das Taxol gelöst ist, halte das Teströhrchen in eine nahezu horizontale Position (die klebrige Polymerlösung wird nicht ausfließen). Setze die Endoprothese in das Röhrchen unter Verwendung einer Pinzette bis zum Boden ein. Erlaube der Polymerlösung, fast zur Öffnung des Teströhrchens zu fließen durch Verdrehen der Öffnung unterhalb der Horizontalen und dann Wiederaufstellen des Teströhrchens in einem Winkel leicht oberhalb der Horizontalen. Entferne die Endoprothese langsam, während die Endoprothese in dem Teströhr-

chen langsam rotiert (etwa 30 Sekunden).

Halte die Endoprothese in einer vertikalen Position, um zu trocknen. Einige der versiegelten Perforationen können aufplatzen, so daß ein Loch in der kontinuierlichen Polymer-schicht existiert. Dies kann geheilt werden durch Wiederholen der obigen Eintauchprozedur, jedoch kann Wiederholung der Prozedur auch zu weiterem Aufplatzen führen und einem allgemein ungleichmäßigen Polymeraufbau. Allgemein ist es besser, die Endoprothese nur einmal einzutauchen und einen Abschnitt der Endoprothese auszuschneiden, der keine aufgeplatze Perforation aufweist. Lagere die Tauchendoprothese in einem versiegelten Behältnis.

#### BEISPIEL 10

##### HERSTELLUNG CHIRURGISCHER "PASTEN"

Wie oben festgehalten, sieht die vorliegende Erfindung eine Vielzahl von Polymer enthaltenden Wirkstoffzusammensetzungen vor, die in einer Vielzahl von klinischen Situationen angewandt werden können. Zum Beispiel können Zusammensetzungen hergestellt werden: (1) als eine "Thermopaste", die an einer erwünschten Stelle als eine Flüssigkeit aufgetragen wird und zu einem Feststoff der erwünschten Form bei einer spezifischen Temperatur (z.B. Körpertemperatur) aushärtet; (2) als ein Spray (d.h. "Nanospray"), das an eine erwünschte Stelle entweder direkt oder durch eine spezialisierte Vorrichtung (z.B. Endoskopie) verabreicht werden kann, und das nachfolgend in einen Feststoff aushärtet, der an dem Gewebe adhäriert, an das es aufgetragen wurde; (3) als ein adhärenter, biegsamer, elastischer, Angiogenese-Inhibitor-Polymerfilm, der auf eine erwünschte Stelle entweder direkt oder durch eine spezialisierte Vorrichtung aufgetragen wird, und der vorzugsweise an der Stelle adhäriert, an der er aufgetragen ist; und (4) als ein

Fluid, das zusammengesetzt ist aus einer Suspension von Mikrosphären in einem geeigneten Trägermedium, die an eine erwünschte Stelle aufgetragen wird entweder direkt oder durch eine spezialisierte Vorrichtung, und die eine Schicht aus Mikrosphären an der Auftragsstelle zurückläßt. Typische Beispiele einer jeden der obigen Ausführungsformen werden detailliert unten angeführt.

#### A. Verfahren zur Herstellung von Thermopaste

Reagenzien und Ausrüstung, die in den folgenden Experimenten verwendet werden, schließen ein eine sterile Glasspritze (1 ml), Heizplatte/Rührer von Corning, 20 ml Glasszintillationsröhrchen, Formen (z.B. 50  $\mu$ l DSC-Wanne oder 50 ml Zentrifugenröhrchendeckelinnenteil), Skalpell und Pinzette, Polycaprolacton ("PCL" - Molekulargewicht 10.000 bis 20.000; Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA), und Taxol (Sigma-Grad 95 % Reinheit Minimum).

Wiege 5,00 g Polycaprolacton direkt in ein 20 ml Glaszintillationsröhrchen. Platziere das Röhrchen in einen 600 ml Becher, der 50 ml Wasser enthält. Erwärme vorsichtig den Becher auf 65°C und halte ihn bei dieser Temperatur für 20 Minuten. Dies erlaubt dem Polymer zu schmelzen. Mische gründlich ein bekanntes Gewicht an Taxol, oder anderen Angiogenese-Inhibitoren in das geschmolzene Polymer bei 65°C. Gieße das geschmolzene Polymer in eine vorab erwärmte (60°C-Ofen) Form. Verwende einen Spatel, um beim Prozeß zu assistieren. Erlaube der Gießform abzukühlen, so daß das Polymer sich verfestigt. Schneide oder Breche das Polymer in kleine Stücke (Größe etwa 2 mm auf 2 mm Größe). Diese Teile müssen in eine 1 ml Glasspritze passen. Entferne den Stempel aus der 1 ml Glasspritze (entferne nicht die Kappe von der Spitze) und gebe ihn auf eine Waage. Stelle die Waage auf Null.

Wiege 0,5 g der Stücke direkt in das offene Ende der Spritze. Platziere die Glasspritze aufrecht (verschlossene Spitze nach unten geneigt) in einem 500 ml Glasbecher, der destilliertes Wasser bei 65°C enthält (Heizplatte von Corning), so daß kein Wasser in den Spritzenkörper eindringt. Das Polymer schmilzt vollständig innerhalb 10 Minuten in dieser Vorrichtung. Wenn die Polymerstücke geschmolzen sind, entferne den Spritzenkörper aus dem Wasserbad, halte ihn horizontal und entferne die Kappe. Führe den Stempel in den Spritzenkörper und komprimiere das geschmolzene Polymer in eine klebrige Masse am spitzen Ende des Spritzenkörpers. Verschließe die Spritze und erlaube ihr, auf Raumtemperatur abzukühlen.

Zur Anwendung kann die Spritze erneut auf 60°C erwärmt werden und als eine Flüssigkeit verabreicht werden, die sich verfestigt, wenn sie auf Körpertemperatur abgekühlt wird.

#### B. Verfahren zur Herstellung von Nanospray

Nanospray ist eine Suspension kleiner Mikrosphären in Kochsalzlösung. Wenn die Mikrosphären sehr klein sind (d.h. unter einem Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ ) bilden sie ein Kolloid, so daß die Suspension unter Schwerkraft nicht sedimentieren wird. Wie detaillierter unten beschrieben ist, kann eine Suspension von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 1  $\mu\text{m}$  Mikropartikeln erzeugt werden, die geeignet ist für Ablagerung auf Gewebe durch ein Finger gepumptes Aerosol. Ausrüstung und Materialien, die verwendet werden können, um Nanospray herzustellen, schließen einen 200 ml Becher mit Wassermantel (Kimax oder Pyrex), zirkulierendes Wasserbad von Haake, Überkopfrührer und Kontrolleinheit mit 2 Inch Durchmesser (4 Blätter, Rührer aus rostfreiem Stahl vom Propellertyp; Marke Fisher), 500 ml Glasbecher, Heizplatte/Rührer (Marke Corning), 4 X 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen (Nalgene), Glasszintillationsröhrchen mit Kunststoffinsertionskappen, Zentrifuge (Beckman), Hochgeschwindigkeitszentrifuge - Boden-

modell (JS 21 Beckman), analytische Waage von Mettler (AJ 100, 0,1 mg), digitale Waage mit Oberbeladung von Mettler (AE 163, 0,01 mg), automatische Pipette (Gilson), sterile Pipettenspitzen, Pumpwirkungs-aerosol (Pfeiffer Pharmaceuticals) 20 ml, Abzug mit laminarer Strömung, Polycaprolacton ("PCL"-Molekulargewicht 10.000 bis 20.000; Polysciences, Warrington, Pennsylvania USA), "gewaschenes" (siehe oben) Ethylenvinylacetat ("EVA"), Poly(DL)Milchsäure ("PLA"-Molekulargewicht 15.000 bis 25.000; Polysciences), Polyvinylalkohol ("PVA"-Molekulargewicht 124.000 bis 186.000; 99 % hydrolysiert; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI USA), Dichlormethan ("DCM" oder "Methylenchlorid;" HPLC-Grad Fisher Scientific), destilliertes Wasser, sterile Saline (Becton and Dickinson oder ähnliches).

#### 1. Herstellung von 5 % (w/v) Polymerlösungen

Abhängig von der herzustellenden Polymerlösung wiege 1,0 g PCL oder PLA oder jeweils 0,5 g PLA und gewaschenes EVA direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen ein. Setze, unter Verwendung eines Meßzylinders, 20 ml DCM zu und verschließe das Röhrchen fest. Belasse das Röhrchen bei Raumtemperatur, 25°C für eine Stunde oder bis sich alles Polymer aufgelöst hat (gelegentliches Schütteln mit der Hand kann verwendet werden). Auflösen des Polymers kann durch visuelle Kontrolle bestimmt werden; die Lösung sollte klar sein. Markiere das Röhrchen mit dem Namen der Lösung und dem Datum, an dem es hergestellt wurde. Lagere die Lösungen bei Raumtemperatur und verwende sie innerhalb zwei Wochen.

#### 2. Herstellung von 3,5 % (w/v) Stammlösung von PVA

Die Lösung kann hergestellt werden, indem der oben angegebenen Prozedur gefolgt wird, oder durch Verdünnen der 5 % (w/v) PVA-Stammlösung, die zur Herstellung von Mikrosphären hergestellt wurde (siehe Beispiel 8). Kurz gesagt werden 17,5 g PVA direkt

in einen 600 ml Glasbecher eingewogen und 500 ml destilliertes Wasser zugesetzt. Gebe einen 3 Inch Teflon-beschichteten Rührfisch in den Becher. Decke den Becher mit einem Deckglas ab, um Verluste durch Verdampfen zu verringern. Platziere den Becher in einen 2.000 ml Glasbecher, der 300 ml Wasser enthält. Dies wird als ein Wasserbad fungieren. Rühre den PVA bei 300 Upm bei 85°C (Heizplatte/Rührer von Corning) für 2 Stunden oder bis vollständig gelöst. Lösen des PVA kann bestimmt werden durch eine visuelle Kontrolle; die Lösung sollte klar sein. Verwende eine Pipette, um die Lösung in einen Lagerungsbehälter mit Glasschraubenverschluß zu überführen und lagere bei 4°C für maximal zwei Monate. Die Lösung sollte auf Raumtemperatur vor Verwendung oder Verdünnung erwärmt werden.

### 3. Verfahren zur Herstellung von Nanospray

Platziere die Rührvorrichtung in einen Abzug. Platziere 100 ml der 3,5 % PVA-Lösung in den 200 ml Becher mit Wassermantel. Verbinde das Haake-Wasserbad mit diesem Becher und erlaube den Inhalten, auf 27°C (+/- 1°C) für 10 Minuten zu äquilibrieren. Stelle die Anfangsgeschwindigkeit des Überkopfrührers auf 3.000 Upm (+/- 200 Upm) ein. Platziere das Blatt des Überkopfrührers zur Hälfte in die PVA-Lösung und starte den Rührer. Tropfe 10 ml Polymerlösung (Polymerlösung, die verwendet wird, auf der Basis des Typs von Nanospray, das produziert werden soll) in den rührenden PVA über eine Zeitspanne von 2 Minuten unter Verwendung einer automatischen 5 ml Pipette. Stelle die Rührgeschwindigkeit nach 3 Minuten auf 2.500 Upm (+/- 200 Upm) ein und belasse den Aufbau für 2,5 Stunden. Entferne das Rührblatt nach 2,5 Stunden von dem Nanospraypräparat und spüle mit 10 ml destilliertem Wasser ab. Erlaube der Abspülllösung, in das Nanospraypräparat einzufließen.

Gieße das Mikrosphärenpräparat in einen 500 ml Becher. Wasche das mit einem Temperiermantel versehene Wasserbad mit 70 ml

destilliertem Wasser. Erlaube der 70 ml Nachspüllösung, in das Mikrosphärenpräparat einzufließen. Rühre das 180 ml Mikrosphärenpräparat mit einem Glasstab und gieße gleiche Mengen davon in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen. Verschließe die Röhrchen. Zentrifugiere die verschlossenen Röhrchen bei 10.000 g ( $\pm$  1.000 g) für 10 Minuten. Ziehe, unter Verwendung einer automatischen 5 ml Pipette oder Vakuumabsaugung, 45 ml der PVA-Lösung von jedem Mikrosphärenpellet ab und verwerfe sie. Setze 5 ml destilliertes Wasser zu jedem Zentrifugenröhrchen zu und verwende einen Vortex, um die Mikrosphären in jedem Röhrchen zu resuspendieren. Vereinige die vier Mikrosphärensuspensionen in ein Zentrifugenröhrchen unter Verwendung von 20 ml destilliertem Wasser. Um die Mikrosphären zu waschen, zentrifugiere das Nanospraypräparat für 10 Minuten bei 10.000 g ( $\pm$  1.000 g). Ziehe den Überstand von dem Mikrosphärenpellet ab. Setze 40 ml destilliertes Wasser zu und verwende einen Vortex, um die Mikrosphären zu resuspendieren. Wiederhole diesen Prozeß zweimal mehr für insgesamt drei Waschungen. Nehme eine vierte Waschung vor, verwende aber nur 10 ml (nicht 40 ml) destilliertes Wasser beim Resuspendieren der Mikrosphären. Überführe das Mikrosphärenpräparat nach der vierten Waschung in ein vorab gewogenes Glasszintillationsröhrchen.

Verschließe das Röhrchen und lasse es für 1 Stunde bei Raumtemperatur (25°C) stehen, um den Mikrosphären mit 2  $\mu$ m und 3  $\mu$ m Durchmesser zu erlauben, unter Schwerkraft auszusedimentieren. Ziehe die oberen 9 ml Suspension unter Verwendung einer automatischen 5 ml Pipette nach 1 Stunde ab. Plaziere die 9 ml in ein steriles verschlossenes 50 ml Zentrifugenröhrchen. Zentrifugiere die Suspension bei 10.000 g ( $\pm$  1.000 g) für 10 Minuten. Verwerfe den Überstand und resuspendiere das Pellet in 20 ml sterile Saline. Zentrifugiere die Suspension bei 10.000 ( $\pm$  1.000 g) für 10 Minuten. Verwerfe den Überstand und resuspendiere das Pellet in steriler Kochsalzlösung. Die Menge an verwendeter Saline hängt von der letztendlich erforder-



derlichen Suspensionskonzentration (gewöhnlicherweise 10 % w/v) ab. Spüle die Aerosolvorrichtung in steriler Saline gründlich und setze die Nanospraysuspension dem Aerosol zu.

C. Herstellung von Taxol-beladenem Nanospray

Verwende Taxol, (Sigma-Grad Reinheit 95 %), um Nanospray, das Taxol enthält, herzustellen. Um die Polymerwirkstoffstammlösung herzustellen, wiege die geeignete Menge Taxol direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen ab. Die geeignete Menge wird bestimmt auf der Basis des Prozentsatzes an Taxol, der in Nanospray sein soll. Wenn z.B. Nanospray, das 5 % Taxol enthält, benötigt werden würde, dann würde die abgewogene Menge an Taxol 25 mg sein, da die Menge an zugesetztem Polymer 10 ml eines 5 % Polymers in DCM-Lösung ist (siehe nächster Schritt).

Setze 10 ml der geeigneten 5 % Polymerlösung zu dem Röhrchen zu, das das Taxol enthält. Verschließe das Röhrchen und wirble oder handschüttle es, um das Taxol zu lösen (visuelle Kontrolle, um zu gewährleisten, daß Taxol gelöst ist). Markiere das Röhrchen mit dem Datum, an dem es hergestellt wurde. Dies sollte verwendet werden, an dem Tag, an dem es hergestellt wird.

Folge den Prozeduren, wie oben beschrieben, ausgenommen, daß die Polymerlösung durch die Polymer-/Wirkstoff (z.B. Taxol)-Stammlösung ersetzt wird.

D. Verfahren zum Herstellen von Film

Die Bezeichnung Film bezieht sich auf ein Polymer, das in einer von vielen geometrischen Formen gebildet ist. Der Film kann ein dünnes, elastisches Polymerblatt oder eine 2 mm dicke

Polymerscheibe sein. Der Film ist konstruiert, um auf exponiertem Gewebe plaziert zu werden, so daß ein enkapsulierter Wirkstoff aus dem Polymer über eine lange Zeitspanne an der Gewebestelle freigesetzt wird. Filme können durch mehrere Prozesse hergestellt werden, einschließlich, z.B. durch Gießen und durch Sprühen.

Bei der Gießtechnik wird Polymer entweder geschmolzen und in eine Form gegossen oder in Dichlormethan gelöst und in eine Form gegossen. Das Polymer verfestigt sich dann entweder wenn es abkühlt oder es verfestigt sich, wenn das Lösungsmittel verdampft. Bei der Sprühtechnik wird das Polymer in Lösungsmittel gelöst und auf Glas aufgesprüht und das Polymer verfestigt sich auf dem Glas, wenn das Lösungsmittel verdampft. Wiederholtes Sprühen erlaubt Aufbauen eines Polymers in einen Film, der vom Glas abgeschält werden kann.

Reagenzien und Ausrüstung, die in diesen Experimenten verwendet werden können, schließen ein einen kleinen Becher, Heizplattenrührer von Corning, Gießformen (z.B. 50 ml Zentrifugenröhrchendeckel) und Formhaltevorrichtung, 20 ml Glasszintillationsröhrchenkappe (vom Kunststoffinsertionstyp), TLC-Zerstäuber, Stickstoffgastank, Polycaprolacton ("PCL" - Molekulargewicht 10.000 bis 20.000; Polysciences), Taxol (Sigma Reinheit 95 %), Ethanol, "gewaschenes" (siehe oben) Ethylenvinylacetat ("EVA"), Poly(DL)Milchsäure ("PLA"-Molekulargewicht 15.000 bis 25.000; Polysciences), Dichlormethan (HPLC-Grad Fisher Scientific).

#### 1. Verfahren zum Herstellen von Filmen - Schmelzgießen

Wiege eine bekannte Menge PCL direkt in einen kleinen Glasbecher. Plaziere den Becher in einen großen Becher, der Wasser enthält (um als Wasserbad zu fungieren) und stelle ihn auf die

heiße Platte bei 70°C für 15 Minuten oder bis das Polymer vollständig geschmolzen ist. Setze eine bekannte Menge Wirkstoff zu dem geschmolzenen Polymer zu und rühre die Mischung gründlich. Um Dispersion des Wirkstoffes in dem geschmolzenen PCL zu unterstützen, kann der Wirkstoff suspendiert/aufgelöst werden in einem geringen Volumen (< 10 % des Volumens des geschmolzenen PCL) von 100 % Ethanol. Diese Ethanolsuspension wird dann in das geschmolzene Polymer eingemischt. Gieße das geschmolzene Polymer in eine Form und lasse es dort, um abzukühlen. Lagere den Film in einem Gefäß nach dem Abkühlen.

## 2. Verfahren zum Herstellen von Filmen - Lösungsmittelgießen

Wiege eine bekannte Menge PCL direkt in ein 20 ml Szintillationsröhrchen ein und gebe ausreichend DCM zu, um eine 10 % w/v-Lösung zu erreichen. Verschließe das Röhrchen und mische die Lösung. Füge hinreichend Taxol zu der Lösung zu, um die erwünschte Taxolendkonzentration zu erreichen. Verwende Handschütteln oder Wirbeln, um das Taxol in der Lösung aufzulösen. Lasse die Lösung für eine Stunde stehen (um die Gegenwart von Luftblasen zu verringern) und gieße es dann langsam in eine Form. Die verwendete Form basiert auf der erwünschten räumlichen Form. Platziere die Form im Abzug über Nacht. Das wird dem DCM erlauben, zu verdampfen. Lasse den Film entweder in der Form, um ihn zu lagern, oder schäle ihn heraus und lagere ihn in einem verschlossenen Container.

## 3. Verfahren zum Herstellen von Filmen - gesprüht

Wiege ausreichend Polymer direkt in ein 20 ml Glasszintillationsröhrchen und setze ausreichend DCM zu, um eine 2 % w/v-Lösung zu erreichen. Verschließe das Röhrchen und mische die Lösung, um Polymer aufzulösen (Handschütteln). Baue die Formen

in vertikaler Orientierung in einer geeigneten Formhaltevorrichtung im Abzug zusammen. Positioniere diese Formhaltevorrichtung 6 bis 12 Inch über dem Boden des Abzugs auf einem geeigneten Träger (z.B. umgedrehter 2.000 ml Glasbecher), um horizontales Sprühen zu erlauben. Überführe, unter Verwendung einer automatischen Pipette, ein geeignetes Volumen (ein Minimum von 5 ml) der 2 % Polymerlösung in ein getrenntes 20 ml Glasszintillationsröhrchen. Setze ausreichend Taxol der Lösung zu und löse es durch Schütteln des verschlossenen Röhrchens mit der Hand. Um es für das Besprühen vorzubereiten, entferne den Deckel dieses Röhrchens und tauche (nur) das Spritzgehäuse eines TLC-Zerstäubers in die Polymerlösung. Beachte: das Vorratsgefäß des Zerstäubers wird in dieser Prozedur nicht verwendet - das 20 ml Glasröhrchen dient als ein Reservoir.

Verbinde den Stickstofftank mit dem Gaseinlaß des Zerstäubers. Erhöhe graduell den Druck bis Zerstäuben und Besprühen beginnt. Notiere den Druck und verwende diesen Druck während der Prozedur. Um die Formen zu besprühen, verwende 5 Sekunden oszillierende Sprühungen mit einer Trockenzeit 15 Sekunden zwischen den Besprühungen. Störe die Gasleitung während der Trockenzeit mit dem Finger, um Verschwendung des Sprays zu vermeiden. Das Besprühen wird fortgesetzt, bis eine geeignete Dicke an Polymer auf der Form abgelagert ist. Die Dicke basiert auf der Anforderung. Lasse die gesprühten Filme an den Formen angelagert und lagere sie in versiegelten Gefäßen.

#### E. Verfahren zum Herstellen von Nanopaste

Nanopaste ist eine Suspension aus Mikrosphären, die in einem hydrophilen Gel suspendiert sind. In einem Aspekt der Erfindung kann das Gel oder die Paste über Gewebe aufgestrichen werden als ein Verfahren zum Lokalisieren von Wirkstoff-bela-

denen Mikrosphären nahe dem Zielgewebe. Da auf Wasserbasis, wird die Paste bald verdünnt werden mit Körperfluiden, was eine Abnahme der Klebrigkeit der Paste und eine Tendenz der Mikrosphären auf nahegelegenen Gewebe abgelagert zu werden verursacht. Ein Pool von Mikrosphären-inkapsuliertem Wirkstoff wird dadurch nahe dem Zielgewebe lokalisiert.

Reagenzien und Ausrüstung, die verwendet werden können in diesen Experimenten, schließen Glasbecher, Carbopol 925 (pharmazeutische Stufe, Goodyear Chemical Co.), destilliertes Wasser, Natriumhydroxid (1 M) in Wasserlösung, Natriumhydroxidlösung (5 M) in Wasserlösung, Mikrosphären im Größenbereich von 0,1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$ , suspendiert in Wasser bei 20 % w/v (siehe oben), ein.

#### 1. Herstellung von 5 % w/v Carbopol-Gel

Gebe eine ausreichende Menge Carbopol zu 1 M Natriumhydroxid zu, um eine 5 % w/v Lösung zu erreichen. Um das Carbopol in dem 1 M Natriumhydroxid zu lösen, erlaube der Mischung, sich für etwa 1 Stunde zu setzen. Rühre die Mischung unter Verwendung eines Glasstabes während dieser Zeitspanne. Bestimme den pH der Mischung nach 1 Stunde. Ein niedriger pH zeigt an, daß das Carbopol nicht vollständig gelöst ist. Der pH, den Sie zu erreichen trachten, beträgt 7,4. Verwende 5 M Natriumhydroxid, um den pH einzustellen. Dies wird erreicht durch langsames Hinzufügen von Tropfen von 5 M Natriumhydroxid zur Mischung, Rühren der Mischung und Bestimmen des pH der Mischung. Es braucht typischerweise in etwa 1 Stunde, um den pH auf 7,4 einzustellen. Wenn ein pH von 7,4 erst einmal erreicht ist, bedecke das Gel und lasse es sich für 2 bis 3 Stunden absetzen. Kontrolliere den pH nach dieser Zeitspanne, um zu gewährleisten, daß er noch bei 7,4 ist. Wenn er sich verändert hat, stelle ihn zurück auf pH 7,4 unter Verwendung von 5 M Natriumhydroxid. Erlaube dem Gel, sich für einige Stunden abzusetzen,

um zu gewährleisten, daß der pH bei 7,4 stabil ist. Wiederhole den Prozeß, bis der erwünschte pH erreicht und stabil ist. Markiere den Behälter mit dem Namen des Gels und dem Datum. Das Gel soll verwendet werden, um Nanopaste innerhalb der nächsten Woche herzustellen.

## 2. Verfahren zum Herstellen von Nanopaste

Gebe ausreichend Mikrosphären mit 0,1  $\mu\text{m}$  bis 3  $\mu\text{m}$  zu Wasser, um eine 20 % Suspension der Mikrosphären herzustellen. Gebe 8 ml des 5 % w/v Carbopolgels in einen Glasbecher. Setze 2 ml der 20 % Mikrosphärensuspension dem Becher zu. Rühre die Mischung unter Verwendung eines Glasstabes oder eines Mischspatels, um die Mikrosphären im gesamten Gel gründlich zu dispergieren. Das dauert typischerweise 30 Minuten. Nachdem die Mikrosphären einmal im Gel dispergiert sind, gebe die Mischung in ein Aufbewahrungsgefäß. Lagere das Gefäß bei 4°C. Sie muß innerhalb eines Monats verwendet werden.

### BEISPIEL 11

KONTROLLIERTE FREISETZUNG VON TAXOL AUS MIKROSPHÄREN,  
DIE ZUSAMMENGESETZT SIND AUS EINER MISCHUNG AUS  
ETHYLENVINYLACETATCOPOLYMER UND POLY(D,L-MILCHSÄURE).  
IN VIVO TEST DER MIKROSPHÄREN IM CAM-TEST

Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung von Taxol beladenen Mikrosphären, die zusammengesetzt sind aus einer Mischung aus biologisch abbaubarem Poly(d,l-Milchsäure) (PLA)-Polymer und nicht abbaubarem Ethylenvinylacetat (EVA)-Copolymer. Zusätzlich wird die in vitro-Freisetzungsrates und anti-angiogene Aktivität von Taxol, das von auf einer CAM platzierten Mikrosphären freigesetzt wird, gezeigt.

Reagenzien, die in diesen Experimenten verwendet wurden,

schließen Taxol, das von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) gekauft wurde; PLA (Molekulargewicht 15.000 bis 25.000) und EVA (60 % Vinylacetat) (gekauft von Polysciences (Warrington, PA); Polyvinylalkohol (PVA) (Molekulargewicht 124.000 bis 186.000, 99 % hydrolysiert, gekauft von Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)) und Dichlormethan (DCM) (HPLC-Grad, erhalten von Fisher Scientific Co.) ein. Destilliertes Wasser wird die ganze Zeit verwendet.

#### A. Herstellung von Mikrosphären

Mikrosphären werden hergestellt im wesentlichen wie beschrieben in Beispiel 8 unter Verwendung des Lösungsmittelverdampfungsverfahrens. Kurz gesagt werden 5 % w/v-Polymerlösungen in 20 ml DCM hergestellt unter Verwendung von Mischungen von EVA:PLA zwischen 35:65 bis 90:10. Zu 5 ml 2,5 % w/v PVA in Wasser in einem 20 ml Glasröhrchen wird 1 ml der Polymerlösung tropfenweise unter Rühren zugegeben. Sechs ähnliche Röhrchen werden zusammengesetzt in einem Überkopfrührer mit sechs Positionen, Auflösungstestvorrichtung (Vanderkamp) und bei 200 Upm gerührt. Die Temperatur dieser Röhrchen wird erhöht von Raumtemperatur auf 40°C über 15 Minuten und bei 40°C für 2 Stunden gehalten. Röhrchen werden bei 500 xg zentrifugiert und die Mikrosphären dreimal in Wasser gewaschen. Bei manchen EVA:PLA-Polymermischungen aggregierten die Mikrosphärenproben während der Waschstufe infolge der Entfernung des Dispersions- oder Emulgiermittels, PVA. Dieser Aggregationseffekt konnte semiquantitativ untersucht werden, da aggregierte Mikrosphären miteinander verschmolzen und die verschmolzene Polymermasse auf der Oberfläche des Waschwassers flotierte. Diese Oberflächenspolymerschicht wird während der Wasserbehandlung verworfen und die verbliebenen, pelletierten Mikrosphären werden gewogen. Die %-Aggregation werden bestimmt aus

$$\% \text{-Aggregation} = \frac{1 - (\text{Gewicht der pelletierten Mikrosphären}) \times 100}{\text{anfängliches Polymergewicht}}$$

Taxol beladene Mikrosphären (0,6 % w/w Taxol) werden durch Auflösen des Taxols in der 5 % w/v Polymerlösung in DCM hergestellt. Die verwendete Polymermischung ist 50:50 EVA:PLA. Eine "große" Größenfraktion und eine "kleine" Größenfraktion von Mikrosphären werden hergestellt durch tropfenweises Zugabe der Taxol/Polymer-Lösung in 2,5 % w/v PVA bzw. 5 % w/v PVA. Die Dispersionen werden bei 40°C bei 200 Upm für 2 Stunden gerührt, zentrifugiert und dreimal in Wasser, wie oben beschrieben, gewaschen. Die Mikrosphären werden luftgetrocknet und wie oben nach Korngrößenklassen unter Verwendung eines optischen Mikroskopes mit einem Stufenmikrometer eingeteilt. Über 300 Mikrosphären werden pro Probe gezählt. Kontrollmikrosphären (ohne Taxol) werden hergestellt und nach Korngrößenklassen, wie oben beschrieben, eingeteilt.

#### B. Verkapselungseffizienz

Bekannte Gewichte an Taxol-beladenen Mikrosphären werden in 1 ml DCM aufgelöst, 20 ml 40 % Acetonitril in Wasser bei 50°C zugesetzt und gewirbelt, bis das DCM verdampft worden war. Die Taxolkonzentration im 40 % Acetonitril wird bestimmt durch HPLC unter Verwendung einer mobilen Phase aus Wasser:Methanol:Acetonitril (37:5:58) bei einer Flußrate von 1 ml/min (isokratische Pumpe von Beckman), einer C8-Umkehrphasensäule (Beckman) und UV-Detektion bei 232 nm. Um die Wiederauffindungseffizienz dieser Extraktionsprozedur zu bestimmen, werden bekannte Gewichte an Taxol von 100 bis 1.000 µg in 1 ml DCM aufgelöst und derselben Extraktionsprozedur dreifach, wie oben beschrieben, unterworfen. Wiedergewinnungen sind immer größer als 85 % und die Werte der Verkapselungseffizienz werden in geeigneter Weise korrigiert.



#### C. Wirkstofffreisetzungsstudien

In 15 ml Glasröhrchen mit Schraubdeckel werden 10 ml 10 mM Phosphat-gepufferte Saline (PBS), pH 7,4 und 35 mg Taxol-beschichtete Mikrosphären plaziert. Die Röhrchen werden bei 37°C und bei gegebenen Zeitintervallen umgestürzt, bei 1.500 xg für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand aufgehoben für die Analyse. Mikrosphärenpellets werden in frischem PBS (10 ml) bei 37°C resuspendiert und inkubiert. Taxolkonzentrationen werden bestimmt durch Extraktion in 1 ml DCM, gefolgt von Verdampfung bis zur Trockne unter einem Stickstoffstrom, Rekonstitution in 1 ml 40 % Acetonitril in Wasser und Analyse unter Verwendung von HPLC, wie oben beschrieben.

#### D. Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Mikrosphären werden auf Probenhaltern plaziert, Sputter-beschichtet mit Gold und Mikrofotos erhalten unter Verwendung eines Philips 501B SEM, betrieben bei 15 kV.

#### E. CAM-Studien

Befruchtete Haushühnchenembryonen werden vor der schalenlosen Kultivierung für 4 Tage inkubiert. Die Einhalte werden bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 3 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert. Am Tag 6 der Inkubation werden 1 mg Aliquots von 0,6 % Taxol-beladenen oder Kontroll (Taxol-freien)-Mikrosphären direkt auf die CAM-Oberfläche plaziert. Nach zweitägiger Exposition wird die Vaskulatur bestimmt unter Verwendung eines Stereomikroskops, das mit einer Videokamera verbunden ist; die Videosignale werden dann auf einem Computer dargestellt und auf Video aufgenommen.

#### F. Ergebnisse

Mikrosphären, die aus 100 % EVA hergestellt sind, sind frei suspendiert in Lösungen von PVA, aggregierten und koaleszierten oder verschmolzen aber extensiv bei nachfolgendem Waschen in Wasser, um das PVA zu entfernen. Mischen von EVA mit einem zunehmenden Anteil von PLA lieferte Mikrosphären, die eine verringerte Neigung aufwiesen, zu aggregieren und zu koaleszieren, wenn in Wasser gewaschen, wie in Fig. 15A beschrieben. Eine 50:50 Mischung von EVA:PLA bildete Mikrosphären mit guter physikalischer Stabilität, d.h., die Mikrosphären blieben diskret und gut suspendiert mit vernachlässigbarer Aggregation und Koaleszenz.

Der Größenbereich für die "kleine" Größenfraktion von Mikrosphären wird bestimmt als > 95 % der Mikrosphärenprobe (bezogen auf das Gewicht) zwischen 10 bis 30  $\mu\text{m}$  und für die "große" Größenfraktion > 95 % der Probe (bezogen auf das Gewicht) zwischen 30 bis 100  $\mu\text{m}$ . Repräsentative Rasterelektronenmikroфотографien von Taxol-beschichteten 50:50 EVA:PLA-Mikrosphären in den "kleinen" und "großen" Größenbereichen sind in Fig. 15B bzw. 15C gezeigt. Die Mikrosphären sind sphärisch mit einer glatten Oberfläche und mit keinem Beweis für festen Wirkstoff auf der Oberfläche der Mikrosphären. Die Effizienz des Beladens von 50:50 EVA:PLA-Mikrosphären mit Taxol beträgt zwischen 95 und 100 % bei anfänglichen Taxolkonzentrationen von zwischen 100 bis 1.000 mg Taxol pro 50 mg Polymer. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede (Student t-Test,  $p < 0,05$ ) zwischen den Verkapselungseffizienzen für entweder "kleine" oder "große" Mikrosphären.

Der Zeitverlauf von Taxolfreisetzung von 0,6 % w/v beladenen 50:50 EVA:PLA-Mikrosphären ist in Fig. 15D für "kleine" (offene Kreise) und "große" (geschlossene Kreise) Mikrosphären gezeigt. Die Freisetzungsratenstudien wurden in drei Röhrchen in drei verschiedenen Experimenten durchgeführt. Die Freisetzungsprofile sind biphasisch mit einer anfänglichen schnellen

Freisetzung von Taxol oder "burst"-Phase, die über die ersten vier Tage von Mikrosphären beider Größenbereiche erfolgt. Dem folgt eine Phase viel langsamerer Freisetzung. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Freisetzungsraten von "kleinen" oder "großen" Mikrosphären. Zwischen 10 bis 13 % des Gesamttaxolgehalts der Mikrosphären wird in 50 Tagen freigesetzt.

Die Taxol beladenen Mikrosphären (0,6 % w/v Beladung) werden getestet unter Verwendung des CAM-Tests und die Ergebnisse werden in Fig. 15E dargestellt. Die Taxolmikrosphären setzen ausreichend Wirkstoff frei, um eine Zone der Avaskularität im umgebenden Gewebe herzustellen (Fig. 15F). Beachte, daß unmittelbar benachbart den Mikrosphären ("MS" in Fig. 15E und 15F) ein Gebiet existiert, in dem Blutgefäße vollständig fehlen (Zone 1); weiter von den Mikrosphären entfernt ist ein Gebiet aus zerrissenen, nicht funktionierenden Kapillaren (Zone 2); nur in einer Entfernung von etwa 6 mm von den Mikrosphären werden die Kapillaren wieder normal. In CAMs, die mit Kontrollmikrosphären (ohne Taxol) behandelt wurden, existiert eine normale Kapillarnetzwerkarchitektur.

### Diskussion

Arterielle Chemoembolisierung ist eine invasive chirurgische Technik. Deshalb würde idealerweise eine chemoembolische Formulierung eines anti-angiogenen und anti-Krebswirkstoffes wie Taxol den Wirkstoff an der Tumorstelle freisetzen in Konzentrationen, die ausreichend sind für Aktivität für eine verlängerte Zeitspanne, in der Größenordnung von einigen Monaten. EVA ist ein Gewebe-kompatibles nicht-abbaubares Polymer, das extensiv für die kontrollierte Freisetzung von Makromolekülen über lange Zeitperioden (> 100 Tage) verwendet worden ist.

EVA wird anfänglich als ein polymeres Biomaterial ausgewählt

zum Herstellen von Mikrosphären mit Taxol, das in der Polymermatrix dispergiert ist. Jedoch aggregierten und koaleszierten Mikrosphären, die mit 100 % EVA hergestellt waren, fast vollständig während der Waschprozedur.

Polymere und Copolymere auf der Basis von Milchsäure und Glykolsäure sind physiologisch inert und biokompatibel und zerfallen durch Hydrolyse in toxikologisch akzeptable Produkte. Copolymere aus Milchsäure und Glykolsäure weisen schnellere Abbauraten auf als PLA und Wirkstoff beschichtete Mikrosphären, die hergestellt sind unter Verwendung dieser Copolymere, sind nicht geeignet für verlängerte, kontrollierte Freisetzung über mehrere Monate. Dollinger und Sawan mischten PLA mit EVA und zeigten, daß die Abbauhalbwertszeit von PLA erhöht ist, wenn der Anteil von EVA in der Mischung erhöht wird. Dies schlägt vor, daß Mischungen aus EVA und PLA eine Polymermatrix vorsehen sollten mit besserer mechanischer Stabilität und Kontrolle der Wirkstofffreisetzungsraten als PLA.

Fig. 15A zeigt, daß Erhöhen des Anteils von PLA in einer EVA:PLA-Mischung den Umfang der Aggregation der Mikrosphärensuspension verringerte. Mischungen von 50 % oder weniger von EVA in der EVA:PLA-Matrix produzierten physikalisch stabile Mikrosphärensuspensionen in Wasser oder PBS. Eine Mischung aus 50:50 EVA:PLA wird ausgewählt für alle nachfolgenden Studien.

Verschiedene Größenbereichsfractionen von Mikrosphären konnten hergestellt werden durch Ändern der Konzentration des Emulgiermittels, PVA, in der wässrigen Phase. "Kleine" Mikrosphären werden hergestellt bei der höheren PVA-Konzentration von 5 % w/v, wohingegen "große" Mikrosphären hergestellt werden bei 2,5 % w/v PVA. Alle anderen Produktionsvariablen sind identisch für beide Mikrosphärengrößenfraktionen. Die höhere Konzentration an Emulgiermittel ergab viskoseres wässriges Dispersionsmedium und produzierte kleine Tröpfchen von Polymer/-

Taxol/DCM, die in der wässrigen Phase emulgierten und somit kleinere Mikrosphären. Die Taxol beladenen Mikrosphären enthielten zwischen 95 bis 100 % des anfänglichen, der organischen Phase zugesetzten Taxols, das innerhalb der festen Mikrosphären enkapsuliert ist. Die geringe Wasserlöslichkeit von Taxol begünstigte ein Verteilen in die organische Phase, die das Polymer enthielt.

Freisetzungsraten von Taxol aus den 50:50 EVA:PLA-Mikrosphären sind sehr langsam, wobei weniger als 15 % des beladenen Taxols in 50 Tagen freigesetzt werden. Die anfängliche "burst"-Phase der Wirkstofffreisetzung kann auf der Diffusion von Wirkstoff von den oberflächlichen Regionen der Mikrosphären (nahe der mikrosphären Oberfläche) beruhen.

Man glaubt, daß der Mechanismus der Wirkstofffreisetzung von nicht abbaubaren Polymermatrices wie EVA Diffusion von Wasser durch die dispergierte Wirkstoffphase innerhalb des Polymers, Auflösen des Wirkstoffes und Diffusion des gelösten Stoffes durch eine Reihe von untereinander verbundenen, flüssigkeitsgefüllten Poren involviert. Man hat gezeigt, daß Mischungen aus EVA und PLA nicht mischbar oder bikontinuierlich sind über einen Bereich von 30 bis 70 % EVA in PLA. In Abbaustudien in PBS-Puffer bei 37°C, nach einer Induktions- oder Lag-Periode, degradierte und erodierte PLA hydrolytisch von der EVA:PLA-Polymermischungsmatrix unter Zurücklassung eines inaktiven Schwamm-ähnlichen Skelets. Obwohl die Induktionsperiode und -rate von PLA-Abbau und Erosion von den gemischten Matrices von dem Anteil von PLA in der Matrix und der Prozeßvorgeschichte abhängen, gibt es in konsistenter Weise wenig oder keinen Verlust an PLA bis nach 40 - 50 Tagen.

Obwohl etwas Erosion von PLA von den 50:50 EVA:PLA-Mikrosphären innerhalb der 50 Tage der *in vitro*-Freisetzungsratenstudie (Fig. 15C) erfolgt sein kann, ist es wahrscheinlich, daß der

Primärmechanismus der Wirkstofffreisetzung von der Polymermischung Diffusion von gelöstem Stoff durch ein Porennetzwerk in der Polymermatrix ist.

Beim Abschluß der Freisetzungsratenstudie werden die Mikrosphären hinsichtlich der Menge des verbliebenen Wirkstoffes untersucht. Die Werte für die Prozent Taxol, die in den Mikrosphärenproben nach 50-tägiger Inkubation verbleiben, sind 94 % +/- 9 % und 89 % +/- 12 % für "große" bzw. "kleine" Größenfraktionsmikrosphären.

Mikrosphären, die mit 6 mg pro mg Polymer (0,6 %) beladen waren, wiesen extensive Inhibierung von Angiogenese auf, wenn auf der CAM der Embryonenküken plaziert (Fig. 15E und 15F).

#### BEISPIEL 12

##### TAXOL-VERKAPSELUNG IN POLY(E-CAPROLACTON) -MIKROSPHÄREN. INHIBIERUNG VON ANGIOGENESE IM CAM-TEST DURCH TAXOL- BELADENE MIKROSPHÄREN

Dieses Beispiel bewertet das *in vitro*-Freisetzungsratenprofil von Taxol von biologisch abbaubaren Mikrosphären aus Poly(E-Caprolacton) und zeigt die anti-angiogene Wirkung von Taxol, das von diesen Mikrosphären freigesetzt wird, wenn auf dem CAM plaziert.

Reagenzien, die in diesen Experimenten verwendet wurden, schließen ein: Poly(E-Caprolacton) ("PCL") (Molekulargewicht 35.000 bis 45.000; gekauft von Polysciences (Warrington, PA)); Dichlormethan ("DCM") von Fisher Scientific Co., Kanada; Polyvinylalkohol (PVA) (Molekulargewicht 1.200 bis 18.000, 99 % hydrolysiert) von Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis.) und Taxol von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sofern nicht anders angegeben, werden alle Chemikalien und Reagenzien wie

geliefert verwendet. Destilliertes Wasser wird die ganze Zeit verwendet.

#### A. Herstellung von Mikrosphären

Mikrosphären werden hergestellt im wesentlichen wie beschrieben in Beispiel 8 unter Verwendung des Lösungsmittelverdampfungsverfahrens. Kurz gesagt werden 5 % w/w Taxol-beladene Mikrosphären hergestellt durch Auflösen von 10 mg Taxol und 190 mg PCL in 2 ml DCM, hinzufügen zu 100 ml 1 % wässriger Lösung von PVP und Rühren bei 1.000 Upm bei 25°C für 2 Stunden. Die Mikrosphärensuspension wird bei 1.000 xg für 10 Minuten zentrifugiert (Beckman GPR), der Überstand entfernt und die Mikrosphären dreimal mit Wasser gewaschen. Die gewaschenen Mikrosphären werden über Nacht luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert. Kontrollmikrosphären (ohne Taxol) werden wie oben beschrieben hergestellt. Mikrosphären, die 1 % und 2 % Taxol enthalten, werden auch hergestellt. Mikrosphären werden nach Korngrößenklassen eingeteilt unter Verwendung eines optischen Mikroskops mit einem Stufenmikrometer.

#### B. Verlapseffizienz

Ein bekanntes Gewicht von Wirkstoff-beladenen Mikrosphären (etwa 5 mg) wird in 8 ml Acetonitril gelöst und 2 ml destilliertes Wasser werden zugegeben, um das Polymer zu präzipitieren. Die Mischung wird bei 1.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und die Menge an enkapsuliertem Taxol wird berechnet aus der Absorbanz des Überstandes, die in einem UV-Spektrophotometer (Hewlett-Packard 8452A Dioden-Array-Spektrophotometer) bei 232 nm gemessen wird.

C. Wirkstofffreisetzungsstudien

Etwa 10 mg Taxol-beladene Mikrosphären werden in 20 ml 10 mM Phosphat-gepufferter Saline, pH 7,4 (PBS) in Schraubdeckelröhrchen suspendiert. Die Röhrchen werden kopfüber gestürzt bei 37°C, und 19,5 ml Überstand bei gegebenen Zeitintervallen entfernt (nachdem man den Mikrosphären erlaubt hatte, sich auf dem Boden abzusetzen), filtriert durch ein 0,45 µm Membranfilter und zurückbehalten für Taxolanalyse. Ein gleiches Volumen PBS wird in jedem Röhrchen wieder plaziert, um Sinkbedingungen während der Studie aufrechtzuerhalten. Die Filtrate werden mit 3 x 1 ml DCM extrahiert, die DCM-Extrakte zur Trockene unter einem Stickstoffstrom verdampft, in 1 ml Acetonitril wieder aufgelöst und mittels HPLC analysiert unter Verwendung einer mobilen Phase aus Wasser:Methanol:Acetonitril (37:5:58) bei einer Flußrate von 1 ml Min<sup>-1</sup> (isokratische Pumpe von Beckman), einer C8-Umkehrphasensäule (Beckman), und UV-Detektion (Shimadzu SPD A) bei 232 nm.

D. CAM-Studien

Befruchtete Haushühnchenembryonen werden für 4 Tage vor der schalenlosen Kultivierung inkubiert. Am Tag 6 der Inkubation werden 1 mg Aliquots 5 % Taxol-beladener oder Kontroll(Taxolfreier)-Mikrosphären direkt auf die CAM-Oberfläche plaziert. Nach einer zweitägigen Exposition wird die Vaskulatur unter Verwendung eines Stereomikroskops untersucht, das mit einer Videokamera verbunden ist; die Videosignale werden dann auf einem Computer dargestellt und mittels Video aufgezeichnet.

E. Rasterelektronenmikroskopie

Mikrosphären werden auf Probenhaltern plaziert, Sputterbeschichtet mit Gold und dann in einem Philips 501B Rasterelektronenmikroskop, das bei 15 kV betrieben wird, plaziert.



## F. Ergebnisse

Der Größenbereich für die Mikrosphärenproben beträgt 30 bis 100 µm, obwohl es in allen Taxol-beladenen oder Kontrollmikrosphärenansätzen Belege gibt, daß einige Mikrosphären aus diesem Bereich herausfallen. Die Beladungseffizienz von PCL-Mikrosphären mit Taxol ist immer größer als 95 % für alle untersuchten Wirkstoffbeladungen. Rasterelektronenmikroskopie zeigte, daß alle Mikrosphären sphärisch sind und viele eine rauhe oder narbige Oberflächenmorphologie zeigten. Es schien so, daß kein Beleg vorlag für festen Wirkstoff auf der Oberfläche der Mikrosphären.

Die Zeitverläufe von Taxolfreisetzung von 1 %, 2 % und 5 % beladenen PCL-Mikrosphären sind in Fig. 16A dargestellt. Die Freisetzungsratenprofile sind zweiphasisch. Es gibt eine anfänglich schnelle Freisetzung von Taxol oder "burst-Phase" bei allen Wirkstoffbeschichtungen. Die burst-Phase trat über 1 bis 2 Tage bei 1 % und 2 % Taxolbeladung und über 3 bis 4 Tage bei mit 5 % beladenen Mikrosphären auf. Der anfänglichen Phase schneller Freisetzung folgt eine Phase wesentlich langsamerer Wirkstofffreisetzung. Bei Mikrosphären, die 1 % oder 2 % Taxol enthalten, gibt es keine weitere Wirkstofffreisetzung nach 21 Tagen. Bei 5 % Taxolbeladung hatten die Mikrosphären etwa 20 % des gesamten Wirkstoffgehaltes nach 21 Tagen freigesetzt.

Fig. 16B zeigt CAMs, die mit Kontroll-PCL-Mikrosphären behandelt wurde, und Fig. 16C zeigt Behandlung mit 5 % Taxol-beladenen Mikrosphären. Die CAM mit den Kontroll-Mikrosphären zeigen eine normale Kapillarnetzwerkarchitektur. Die CAM, die mit Taxol-PCL-Mikrosphären behandelt ist, zeigt ausgeprägte Vaskularregression und Zonen, denen kapillares Netzwerk fehlt.

## G. Diskussion

Das Lösungsmittelverdampfungsverfahren zur Herstellung Taxol-beladener Mikrosphären lieferte sehr hohe Taxolverkapselungseffizienzen von zwischen 95 bis 100 %. Das beruht auf der geringen Wasserlöslichkeit von Taxol und seiner hydrophoben Natur, die die Verteilung in der organischen Lösungsmittelphase bevorzugt, die das Polymer enthält.

Das zweiphasische Freisetzungsprofil für Taxol ist typisch für das Freisetzungsmuster vieler Wirkstoffe von biologisch abbaubaren Polymermatrizes. Poly(E-Caprolacton) ist ein aliphatischer Polyester, der durch Hydrolyse unter physiologischen Bedingungen abgebaut werden kann und ist nicht toxisch und gewebekompatibel. Der Abbau von PCL ist wesentlich langsamer als der der extensiv untersuchten Polymere und Copolymere von Milchsäure und Glykolsäure und ist deshalb geeignet für die Konstruktion von Langzeitwirkstofffreisetzungssystemen. Die anfängliche schnelle oder burst-Phase der Taxolfreisetzung soll auf Diffusionsfreisetzung des Wirkstoffs aus der Oberflächenregion der Mikrosphären (nahe der Mikrosphärenoberfläche) herrühren. Freisetzung von Taxol in der zweiten (langsameren) Phase der Freisetzungsprofile beruht wahrscheinlich nicht auf Abbau oder Erosion von PCL, da Studien gezeigt haben, daß unter *in vitro* Bedingungen in Wasser kein signifikanter Gewichtsverlust oder Oberflächenerosion von PCL über eine 7,5-wöchige Periode auftritt. Die langsamere Phase der Taxolfreisetzung beruht wahrscheinlich auf Auflösung des Wirkstoffes innerhalb flüssigkeitserfüllter Poren in der Polymermatrix und Diffusion durch die Poren. Die größere Freisetzungsrates bei höherer Taxolbeschichtung ist wahrscheinlich ein Ergebnis eines extensiveren Porennetzwerkes innerhalb der Polymermatrix.

Man hat gezeigt, daß Taxolmikrosphären mit 5 % Beladung hinreichend Wirkstoff freisetzen, um extensive Inhibierung von

Angiogenese herzustellen, wenn auf der CAM plaziert. Die Inhibierung von Blutgefäßwachstum führte zu einer avaskulären Zone, wie in Fig. 16C gezeigt.

### BEISPIEL 13

TAXOL-BELADENE POLYMERFILME, DIE AUS ETHYLENVINYLACETAT UND EINEM OBERFLÄCHENAKTIVEN MITTEL ZUSAMMENGESETZT SIND

Zwei Typen von Filme werden hergestellt, im wesentlichen wie beschrieben in Beispiel 10: reine EVA-Filme, die mit Taxol beladen sind, und Filme aus Mischungen von EVA und oberflächenaktivem Mittel (d.h. Pluronic F127, Span 80 und Pluronic L101), die mit Taxol beladen sind.

Die oberflächenaktiven Mittel, die untersucht werden, sind zwei hydrophobe oberflächenaktive Mittel (Span 80 und Pluronic L101) und ein hydrophiles oberflächenaktives Mittel (Pluronic F127). Die Pluronic-oberflächenaktiven Mittel sind selbst Polymere, was eine attraktive Eigenschaft ist, da sie mit EVA gemischt werden können, um verschiedene Wirkstofffreisetzungseigenschaften zu optimieren. Span 80 ist ein kleineres Molekül, das in einer Weise in der Polymermatrix dispergiert ist und keine Mischung bildet.

Oberflächenaktive Mittel werden hilfreich sein beim Modulieren der Freisetzungsrates von Taxol von Filmen und Optimieren bestimmter physikalischer Parameter der Filme. Ein Aspekt der Filme mit Beimischung von oberflächenaktivem Mittel, der anzeigt, daß die Wirkstofffreisetzungsraten kontrolliert werden können, ist die Fähigkeit, die Rate und den Umfang, mit dem die Komponente in Wasser schwellen wird, zu variieren. Diffusion von Wasser in eine Polymer-Wirkstoffmatrix ist für die Freisetzung von Wirkstoff vom Träger kritisch. Fig. 17C und

17D zeigen den Grad des Schwellens des Films, wenn der Umfang des oberflächenaktiven Mittels in der Mischung geändert wird. Reine EVA-Filme schwellen nicht in wesentlichem Umfang innerhalb zweier Monate. Es ist jedoch durch Erhöhen des Umfangs des zu dem EVA zugesetzten oberflächenaktiven Mittels möglich, den Grad der Schwellung der Komponente zu erhöhen und Schwellen kann auch erhöht werden durch Erhöhen der Hydrophilie.

Ergebnisse der Experimente mit diesen Filmen werden unten in Fig. 17A - E gezeigt. Kurz gesagt zeigt Fig. 17A Taxolfreisetzung (in mg) über die Zeit von reinen EVA-Filmen. Fig. 17B zeigt den Prozentsatz an zurückbleibendem Wirkstoff für denselben Film. Wie aus diesen beiden Figuren ersichtlich, erhöhen sich Wirkstofffreisetzungsraten, wenn sich die Taxolbeladung erhöht, und zeigt die erwartete Konzentrationsabhängigkeit. Wenn die Taxolbeladung erhöht wird, erhöhen sich auch die Prozent Taxol, die im Film bleiben, was anzeigt, daß höhere Beladung für Langzeitfreisetzungsformulierungen attraktiver sein kann.

Physikalische Stärke und Elastizität der Filme wird bewertet in Fig. 17E. Kurz gesagt zeigt Fig. 17E Streß-/Dehnungskurven für reine EVA-Filme und Filme aus Mischungen von EVA und oberflächenaktivem Mittel. Diese grobe Messung von Streß zeigt, daß sich die Elastizität von Filmen mit Zusatz von Pluronic F127 erhöht, und daß die Zugfestigkeit (Streß auf Brechen) erhöht wird in einer konzentrationsabhängigen Weise mit dem Zusatz von Pluronic F127. Elastizität und Stärke sind wichtige Betrachtungen beim Konstruieren eines Filmes, der für spezielle klinische Anwendungen manipuliert werden kann, ohne permanente Deformation der Verbindung zu verursachen.

Die obigen Daten zeigen die Fähigkeit bestimmter Zusätze an oberflächenaktiven Mitteln, die Wirkstofffreisetzungsraten zu kontrollieren und die physikalischen Charakteristika des Vehi-

kels zu ändern.

#### BEISPIEL 14

##### EINBAU VON METHOXYPOLYETHYLENGLYKOL 350 (MePEG) IN POLY(E-CAPROLACTON), UM EINE FORMULIERUNG FÜR DIE KONTROLLIERTE FREISETZUNG VON TAXOL AUS EINER PASTE ZU ENTWICKELN

Reagenzien und Ausrüstung, die verwendet wurden in diesen Experimenten, schließen ein Methoxypolyethylenglykol 350 ("MePEG" - Union Carbide, Danbury, CT). MePEG ist bei Raumtemperatur flüssig und weist einen Gefrierpunkt von 10° bis -5°C auf.

#### A. Herstellung einer MePEG/PCL-Taxol-enthaltenden Paste

MePEG/PCL-Paste wird hergestellt, indem zuerst eine Menge Taxol in MePEG gelöst wird und dann dieses in geschmolzenes PCL eingebaut wird. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, daß kein DCM benötigt wird.

#### B. Analyse des Schmelzpunktes

Der Schmelzpunkt von PCL/MePEG-Polymermischungen kann bestimmt werden durch differentielle Rasterkalorimetrie von 30°C bis 70°C bei einer Heizrate von 2,5°C pro Minute. Ergebnisse dieser Experimente sind in Fig. 18A und 18B dargestellt. Kurz gesagt, wie in Fig. 18A gezeigt, ist der Schmelzpunkt der Polymermischung (wie bestimmt durch Thermalanalyse) durch MePEG in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise verringert. Der Schmelzpunkt der Polymermischungen als eine Funktion der MePEG-Konzentration ist gezeigt in Fig. 18A. Dieser geringere Schmelzpunkt drückt sich auch aus in einer verlängerten Zeit für die Polymermischungen, um sich aus der Schmelze zu verfestigen, wie gezeigt in Fig. 18B. Eine 30:70-Mischung von Me-

PEG:PCL benötigt mehr als zweimal so lange, um sich aus der Flüssigkeitsschmelze zu verfestigen als PCL alleine.

C. Messen von Sprödigkeit

Einbau von MePEG in PCL scheint, verglichen mit PCL alleine, einen weniger spröden Feststoff zu liefern. Als ein "ungefährer" Weg, dies zu quantifizieren, wird eine gewogene Nadel von einer gleichen Höhe in Polymermischungen fallengelassen, die von 0 % bis 30 % MePEG in PCL enthalten, und die Strecke, die die Nadel in den Feststoff eindringt, wird dann gemessen. Der resultierende Graph ist als Fig. 18C gezeigt. Punkte werden angegeben als der Durchschnitt von vier Messungen  $\pm$  1 S.D.

Zu Zwecken des Vergleichs wird ebenfalls eine Paraffinwachsprobe getestet und die Nadel drang darin eine Strecke von 7,25 mm  $\pm$  0,3 mm ein.

D. Messen von Taxolfreisetzung

Pellets aus Polymer (PCL enthaltend 0 %, 5 %, 10 % oder 20 % MePEG) werden in Phosphat-gepufferter Saline (PBS, pH 7,4) bei 37°C inkubiert und Prozentänderung des Polymergewichts wird über die Zeit gemessen. Wie aus Fig. 18D ersichtlich, erhöht sich die Menge an verlorenem Gewicht mit der Konzentration von MePEG, die ursprünglich in der Mischung vorhanden war. Es ist wahrscheinlich, daß dieser Gewichtsverlust auf der Freisetzung von MePEG aus der Polymermatrix in die Inkubationsflüssigkeit herrührt. Das würde anzeigen, daß Taxol leicht aus MePEG/PCL-Mischung freigesetzt werden wird, da Taxol vor Einbau in PCL zuerst in MePEG gelöst wird.

E. Wirkung verschiedener Mengen an MePEG auf Taxolfreisetzung

Thermopasten werden hergestellt, die zwischen 0,8 % und 20 % MePEG in PCL enthalten. Diese werden mit 1 % Taxol beladen. Die Freisetzung von Taxol über die Zeit aus 10 mg Pellets in PBS-Puffer bei 37°C wird unter Verwendung von HPLC überwacht. Wie in Fig. 18E gezeigt, beeinflußt die Menge an MePEG in der Formulierung die Menge an Taxol, die freigesetzt wird, nicht.

F. Wirkung verschiedener Mengen an Taxol auf die Gesamtmenge von freigesetztem Taxol aus 20 % MePEG/PCL-Mischung

Thermopasten werden hergestellt, die 20 % MePEG in PCL enthalten und mit zwischen 0,2 % und 10 % Taxol beladen sind. Die Freisetzung von Taxol über die Zeit wird wie oben beschrieben gemessen. Wie in Fig. 18F gezeigt, erhöht sich die Menge an über die Zeit freigesetztem Taxol mit erhöhter Taxolbeladung. Wenn als Prozent insgesamt freigesetzten Taxols aufgetragen, ist die Anordnung jedoch umgekehrt (Fig. 18G). Das liefert die Information über das Resttaxol, das in der Paste zurückbleibt und, wenn Annahmen vorgenommen werden über die Validität, diese Daten zu extrapolieren, erlaubt eine Projektion der Zeitperiode, über die Taxol aus der 20 % MePEG Thermopaste freigesetzt werden wird.

G. Stärkeanalyse verschiedener MePEG/PCL-Mischungen

Ein mechanischer Stärketester CT-40 wird verwendet, um die Stärke fester Polymer-"Tabletten" mit einem Durchmesser von 0,8 cm und einer Durchschnittsdicke von 0,560 cm zu testen. Die Polymertabletten sind Mischungen von MePEG bei Konzentrationen von 0 %, 5 %, 10 % oder 20 % in PCL.

Ergebnisse dieses Tests sind in Fig. 18H gezeigt, wo sowohl die Zugfestigkeit als auch die Zeit bis zum Scheitern als eine Funktion von % MePEG in der Mischung aufgetragen sind. Einzelne variable ANOVA zeigten an, daß die Tablettendicken inner-

halb jeder Gruppe nicht verschieden sind. Wie aus Fig. 18H ersichtlich, verringerte der Zusatz von MePEG zu PCL die Härte des resultierenden Feststoffes.

#### BEISPIEL 15

##### WIRKUNG VON TAXOL-BELADENER THERMOPASTE AUF ANGIOGENESE IN VIVO

Befruchtete Haushühnchenembryonen wurden für 4 Tage vor schalenloser Kultur inkubiert, wie beschrieben in Beispiel 2. Die Eierinhalte wurden aus der Schale entfernt und in sterilisierte Glasschüsseln mit Rundboden entleert und mit Petrischalendeckeln abgedeckt.

Taxol wird in Thermopaste mit Konzentrationen von 5 %, 10 % und 20 % (w/v) eingebaut, im wesentlichen wie oben beschrieben (siehe Beispiel 10), und in den folgenden Experimenten verwendet. Getrocknete geschnittene Thermopaste wird dann auf 60°C erhitzt und zwischen zwei Lagen Paraffin gepreßt, und dadurch geglättet, und man erlaubt ihr, abzukühlen. Sechs Embryos erhielten 20 % Taxol-beladene Thermopaste und sechs Embryos erhielten unbeladene Thermopaste, die in dieser Art und Weise hergestellt wurde. Ein Embryo starb in jeder Gruppe, was 5 Embryonen in jeder der Kontroll- und behandelten Gruppen belies.

Unbeladene Thermopaste und Thermopaste, die 20 % Taxol enthielt, wurden auch auf 60°C erwärmt und direkt auf die wachsende Kante einer jeden CAM direkt plaziert am Tag 6 der Inkubation; jeweils zwei Embryos wurden auf diese Weise behandelt.

Es gab keine offensichtlichen Unterschiede in den Ergebnissen, die unter Verwendung der verschiedenen Verabreichungsverfahren erreicht wurden, was anzeigt, daß die Temperatur der Paste zum



Zeitpunkt der Applikation kein Faktor hinsichtlich des Ergebnisses war.

Thermopaste mit 10 % Taxol wurde auf 11 CAMs aufgetragen und unbeladene Thermopaste wurde auf weitere 11 CAMs aufgetragen, während 5 % Taxol-beladene Thermopaste auf 10 CAMs aufgetragen wurde und unbeladene Thermopaste auf 10 weitere Kontroll-CAMs aufgetragen wurde. Nach zweitägiger Exposition (Tag 8 der Inkubation) wurde die Vaskulatur mit Hilfe eines Stereomikroskops untersucht. Liposyn II, eine weiße opake Lösung, wurde in die CAM injiziert, um die Sichtbarkeit der vaskularen Details zu erhöhen.

In den mit 5 % Taxol-beladener Paste behandelten Embryonen wiesen nur 2 Tiere maximale Inhibierung von Angiogenese auf, während die übrigen 8 nur marginal betroffen waren. Von den mit 10 % Taxol beladener Thermopaste behandelten Tieren zeigten nur 2 maximale Inhibierung, während die anderen 9 nur marginal betroffen waren.

Die 20 % Taxol-beladene Thermopaste zeigte extensive Gebiete von Avaskularität (siehe Fig. 19B) bei allen 5 der CAMs, die diese Behandlung erfuhren. Der höchste Grad der Inhibierung wurde als eine Region der Avaskularität definiert, die eine Größe von 6 mm auf 6 mm abdeckte. Alle CAMs, die mit 20 % Taxol beladener Thermopaste behandelt waren, wiesen diesen Umfang der Angiogeneseinhibierung auf.

Im Vergleich inhibierte die Kontroll-Thermopaste (unbeladen) Angiogenese auf der CAM nicht (siehe Fig. 19A). Diese Ansicht unter stärkerer Vergrößerung (beachte, daß die Kante der Paste am oberen Rand des Bildes zu sehen ist) zeigt, daß die Gefäße nahe der Paste durch die Thermopaste nicht beeinflusst werden. Dies schlägt vor, daß der beobachtete Effekt auf der anhaltenden Freisetzung von Taxol beruht und nicht auf dem Polymer

selbst oder durch einen sekundären Druckeffekt der Paste auf die sich entwickelnde Vaskulatur.

Diese Studie zeigt, daß Thermopaste wirksame Mengen Angiogeneseinhibitoren (in diesem Falle Taxol) freisetzt, um die normale Entwicklung der CAM-Vaskulatur zu inhibieren.

#### BEISPIEL 16

##### WIRKUNG VON TAXOL-BELADENER THERMOPASTE AUF TUMORWACHSTUM UND TUMORANGIOGENESE *IN VIVO*

Befruchtete Haushühnchenembryonen werden für 3 Tage inkubiert, bevor ihre Schalen entfernt werden. Die Eihalte werden geleert durch Entfernen der Schale, die um den Luftraum angeordnet ist, Abtrennen der inneren Schalenmembran, Perforieren des gegenüberliegenden Endes der Schale und Erlauben, daß die Eihalte vorsichtig aus dem glattendig gemachten Ende herausgleiten. Die Inhalte werden in sterilisierte Glasschüsseln mit Rundboden geleert, mit Petrischalenabdeckungen abgedeckt und bei 90 % relativer Luftfeuchte und 3 % Kohlendioxid inkubiert (siehe Beispiel 2).

MDAY-D2-Zellen (ein muriner lymphoider Tumor) werden in Mäuse injiziert und man erlaubt, daß sie zu Tumoren heranwachsen, die 0,5 bis 1,0 g wiegen. Die Mäuse werden getötet, die Tumorstellen mit Alkohol abgewischt, exzidiert, in sterile Gewebekulturmedien plziert und unter einem Abzug mit Laminarströmung in Würfel von 1 mm Größe geschnitten. Bevor die zergliederten Tumoren auf 9 Tage alte Hühnchenembryonen gegeben werden, werden CAM-Oberflächen vorsichtig mit einer 30-Gauge-Nadel abgeschabt, um Tumorimplantationen sicherzustellen. Die Tumoren werden dann auf den CAMs nach 8-tägiger Inkubation (4 Tage nach Entfernen der Schalen) plziert und für 4 Tage auf der CAM zu wachsen erlaubt, um eine Vaskularversorgung zu er-

richten. 4 Embryonen werden unter Verwendung dieses Verfahrens präpariert, wobei jeder Embryo 3 Tumoren erhält. Für diese Embryonen erhielt ein Tumor 20 % Taxol-beladene Thermopaste, der zweite Tumor unbeladene Thermopaste und der dritte Tumor keine Behandlung. Die Behandlungen wurden für zwei Tage fortgesetzt, bevor die Ergebnisse aufgezeichnet wurden.

Die explantierten MDAY-D2-Tumoren sekretieren angiogene Faktoren, die das Einwachsen von Kapillaren (abstammend von der CAM) in die Tumormasse induzieren, und erlauben ihr, ihr Größenwachstum fortzusetzen. Da alle Gefäße des Tumors von der CAM abstammen, während alle Tumorzellen von dem Explantat abstammen, ist es möglich, die Wirkung therapeutischer Maßnahmen auf diese zwei Prozesse unabhängig zu bewerten. Dieser Test ist verwendet worden, um die Wirksamkeit von Taxol-beladener Thermopaste zu bestimmen auf: (a) Inhibieren der Vaskularisierung des Tumors und (b) Inhibieren des Wachstums der Tumorzellen selbst.

Direkte in vivo stereomikroskopische Bewertung und histologische Untersuchung fixierter Gewebe aus dieser Studie zeigten das Folgende. In den mit 20 % Taxol-beladener Thermopaste behandelten Tumoren trat eine Reduktion der Anzahl der Blutgefäße, die den Tumor versorgten (siehe Fig. 20C und 20D), eine Verringerung der Anzahl von Blutgefäßen im Tumor und eine Verringerung der Anzahl von Blutgefäßen in der Peripherie des Tumors (das Gebiet, das typischerweise in einem festen Tumor am höchsten vaskularisiert ist) auf, wenn verglichen mit Kontrolltumoren. Die Tumoren begannen, sich hinsichtlich Größe und Masse, während der zwei Tage, in denen die Studie durchgeführt wurde, zu verringern. Zusätzlich wurden viele Endothelialzellen gesehen, die in der Zellteilung arretiert waren, was anzeigt, daß Endothelzellenproliferation beeinflusst worden war. Man beobachtete auch häufig, daß Tumorzellen in der Mitosis gehemmt worden waren. Alle 4 Embryonen zeigten ein konsi-

stentes Muster, wobei die 20 % Taxol-beladene Thermopaste Tumorstromvaskularität unterdrückte, wohingegen die unbeladene Thermopaste keine Wirkung zeigte.

In CAMs, die mit unbeladener Thermopaste behandelt waren, waren die Tumoren gut vaskularisiert mit einer Zunahme der Anzahl und Dichte von Blutgefäßen, verglichen zu der des normalen umgebenden Gewebes und es wurden dann dramatisch mehr Gefäße als in den Tumoren beobachtet, die mit Taxol-beladener Paste behandelt worden waren. Die neu gebildeten Gefäße traten in den Tumor von allen Seiten ein, was aussah wie Speichen, die mit der Mitte eines Rades befestigt sind (siehe Fig. 20A und 20B). Die Kontrolltumoren wuchsen weiterhin hinsichtlich Größe und Masse während des Verlaufs der Studie. Histologisch wurden viele dilatierte einwandige Kapillaren in der Peripherie des Tumors und wenig Endotheliale in Zellteilung gesehen. Das Tumorgewebe war gut vaskularisiert und durch und durch lebend.

Als ein Beispiel wurden in zwei Tumoren mit ähnlicher Größe (anfangs, zum Zeitpunkt der Explantation), die auf dieselbe CAM platziert waren, die folgenden Daten erhalten. Für den Tumor, der mit 20 % Taxol-beladener Thermopaste behandelt war, maß der Tumor 330 mm x 597 mm; die unmittelbare Peripherie des Tumors wies 14 Blutgefäße auf, während die Tumormasse nur 3 bis 4 kleine Kapillaren aufweist. Für den Tumor, der mit unbeladener Thermopaste behandelt war, betrug die Tumorgröße 623 x 678 mm; die unmittelbare Peripherie des Tumors weist 54 Blutgefäße auf, während die Tumormasse 12 bis 14 kleine Blutgefäße aufweist. Zusätzlich enthielt die umgebende CAM selbst viel mehr Blutgefäße verglichen mit der Region, die den Taxol-behandelten Tumor umgibt.

Diese Studie zeigt, daß die Thermopaste ausreichende Menge Angiogeneseinhibitoren (in diesem Fall Taxols) freisetzt, um

die pathologische Angiogenese, die Tumorstadium und -entwicklung begleitet, zu inhibieren. Unter diesen Umständen wird Angiogenese maximal durch die Tumorzellen stimuliert, die angiogene Faktoren produzieren, die in der Lage sind, Einwachsen von Kapillaren aus dem umgebenden Gewebe in die Tumormasse zu induzieren. Die 20 % Taxol-beladene Thermopaste ist in der Lage, diesen Prozeß zu blockieren und die Fähigkeit des Tumorgewebes zu begrenzen, eine geeignete Blutversorgung aufrechtzuerhalten. Diese führt zu einer Verringerung der Tumormasse sowohl durch einen zytotoxischen Effekt des Wirkstoffes auf die Tumorzellen selbst, als auch dadurch, daß dem Gewebe die für Wachstum und Expansion benötigten Nährstoffen entzogen werden.

#### BEISPIEL 17

##### WIRKUNG VON ANGIOGENESEINHIBITOR-BELADENER THERMOPASTE AUF IN VIVO TUMORWACHSTUM IN EINEM MURINEN TUMORMODELL

Das murine MDAY-D2-Tumormodell kann verwendet werden, um die Wirkung lokaler langsamer Freisetzung der chemotherapeutischen und anti-angiogenen Verbindungen, wie Taxol, auf Tumorstadium, Tumormetastase und Überleben des Tieres zu untersuchen. Die MDAY-D2-Tumorzelllinie wird in einer Zellsuspension kultiviert, die 5 % fötales Kälberserum in Alpha-mem-Medium umfaßt. Die Zellen werden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre inkubiert, die mit 5 % Kohlendioxid supplementiert ist, und werden um einen Faktor 15 alle 3 Tage verdünnt, bis eine ausreichende Anzahl Zellen erhalten wird. Nach der Inkubationsperiode werden die Zellen durch Lichtmikroskopie hinsichtlich Lebensfähigkeit untersucht und dann bei 1.500 Upm für 5 Minuten zentrifugiert. PBS wird zu den Zellen zugesetzt, um eine Verdünnung von 1 Million Zellen pro ml zu erhalten.

Zehn Tage alte weibliche DBA/2j Mäuse werden für 3 bis 4 Tage

nach Ankunft akklimatisiert. Jeder Maus werden dann subkutan in die posteriolaterale Flanke 100.000 MDAY-D2-Zellen in 100 ml PBS injiziert. Frühere Studien haben gezeigt, daß diese Prozedur einen sichtbaren Tumor an der Injektionsstelle in 3 bis 4 Tagen ergibt, der eine Größe von 1,0 bis 1,7 g innerhalb von 14 Tage erreicht und 19 bis 25 Tage nach der Injektion sichtbare Metastasen in der Leber produziert. Abhängig vom Ziel der Studie kann eine therapeutische Intervention an einem jeden Punkt in der Progression der Erkrankung in Gang gesetzt werden.

Unter Verwendung des obigen Tiermodells wurden 20 Mäusen 140.000 MDAY-D2-Zellen s.c. injiziert und man lies die Tumoren wachsen. Am Tag 5 werden die Mäuse in Gruppen zu 5 aufgeteilt. Die Tumorstelle wurde chirurgisch unter Betäubung geöffnet, die lokale Region mit der Wirkstoff-beladenen Thermopaste oder Kontrollthermopaste behandelt, ohne das existierende Tumorge-webe zu stören, und die Wunde wurde verschlossen. Die Gruppen zu 5 erhielten entweder keine Behandlung (Wunde lediglich geschlossen), Polymer (PCL) alleine, 10 % Taxol-beladene Thermopaste, oder 20 % Taxol-beladene Thermopaste (nur 4 Tieren injiziert), die benachbart der Tumorstelle implantiert wurde. Am Tag 16 wurden die Mäuse getötet, die Tumoren zergliedert und untersucht (im ganzen und histologisch) auf Tumorstadium, Tumormetastase, lokale und systemische Toxizität, die aus der Behandlung resultiert, Wirkung auf Wundheilung, Wirkung auf Tumorstadium und Zustand der Paste, die an der Inzisions-stelle verblieb.

Die Gewichte der Tumoren für jedes Tier sind in der Tabelle unten gezeigt:

**Tabelle IV**  
**Tumorgewichte (Gm)**

<b>Tier Nr.</b>	<b>Kontrolle (leer)</b>	<b>Kontrolle (PCL)</b>	<b>10 % Taxol- Thermopaste</b>	<b>20 % Taxol- Thermopaste</b>
1	1,387	1,137	0,487	0,114
2	0,589	0,763	0,589	0,192
3	0,461	0,525	0,447	0,071
4	0,606	0,282	0,274	0,042
5	0,353	0,277	0,362	
<b>Mittel</b>	0,6808	0,6040	0,4318	0,1048
<b>Standard- abweichung</b>	0,4078	0,3761	0,1202	0,0653
<b>P-Wert</b>		0,7647	0,358	0,036

Thermopaste, die mit 20 % Taxol beladen war, verringerte Tumorstadium um über 85 % (Durchschnittsgewicht 0,105), verglichen mit Kontrolltieren (Durchschnittsgewicht 0,681). Tiere, die mit Thermopaste alleine oder Thermopaste, die 10 % Taxol enthielt, behandelt waren, wiesen nur geringste Wirkungen hinsichtlich Tumorstadium auf; Tumorgewichte waren verringert um nur 10 % bzw. 35 % (Fig. 21A). Somit war Thermopaste, die 20 % Taxol enthielt, wirksamer hinsichtlich Verringerung des Tumorstadiums als Thermopaste, die 10 % Taxol enthielt (siehe Fig. 21C; siehe auch Fig. 21B).

Thermopaste wurde nachgewiesen in einigen der Tieren an der Verabreichungsstelle. Polymer, das hinsichtlich Gewicht zwischen 0,026 g und 0,078 g schwankte, wurde in 8 von 15 Mäusen nachgewiesen. Jedes Tier in der Gruppe enthielt 20 % Taxol-beladene Thermopaste, die etwas Restpolymer enthielt, was vor schlägt, daß es hinsichtlich Auflösung weniger empfindlich war. Histologisch enthielten die mit Taxol-beladener Thermopaste behandelten Tiere weniger Zellstruktur und mehr Gewebene-

krose als Kontrolltumoren. Die Vaskulatur war verringert und man sah häufig, daß Endothelialzellen in der Zellteilung gehemmt waren. Die Taxol-beladene Thermopaste schien die Integrität der Zellstruktur der Haut oder des Gewebes, die den Tumor umgeben, nicht zu beeinflussen.

#### BEISPIEL 18

##### DIE VERWENDUNG VON MIT ANGIOGENESE-INHIBITOR BELADENEN CHIRURGISCHEN FILMEN BEI DER PRÄVENTION IATROGENER METASTATISCHER AUSSAAT VON TUMORZELLEN WÄHREND KREBSRESEKTIONSCHIRURGIE

Da eine sterile, biegsame, dehnbare Wirkstoff-Polymerverbindung hilfreich wäre während Krebsresektionsprozeduren. Oft ist es wünschenswert, die normalen umgebenden Gewebe von malignem Gewebe während Resektionsoperationen zu isolieren, um iatrogene Verbreitung der Krankheit auf benachbarte Organe durch unabsichtliche Kontamination durch Krebszellen zu vermeiden. Ein Wirkstoff-beladener Parafilm könnte über normales Gewebe gestreckt werden vor Manipulation des Tumors. Das wäre äußerst hilfreich, wenn um die Leber und andere abdominale Inhalte während Darmkrebsresektionschirurgie plazierte, um intraperitoneale Verbreitung der Krankheit auf die Leber zu verhindern. Ein biologisch abbaubarer Film könnte in situ zurückgelassen werden, um fortgesetzten Schutz vorzusehen.

Inzisionsstellen sind auch häufige Stellen postoperativen Wiederauftretens von Malignität. Man nimmt an, daß dies auf Kontamination der Wundstelle mit Tumorzellen während der chirurgischen Prozedur beruht. Um sich diesen Punkten zuzuwenden, werden Experimente durchgeführt mit dem Ziel, die Fähigkeit von Angiogeneseinhibitor-beladenen Filmen zu bestimmen, dieses Phänomen zu verhindern.



#### A. Materialien und Methoden

Herstellung von chirurgischen Filmen. Chirurgische Filme werden hergestellt wie beschrieben in Beispiel 10. Dünne Filme, die etwa 1 cm x 1 cm messen, werden hergestellt, die entweder Polymer alleine (PCL) oder PCL beladen mit 5 % Taxol enthalten.

Rattenlebertumormodell. In einer ersten Studie wurden Wistar-Ratten, die etwa 300 g wogen, einer allgemeinen Betäubung unterzogen und eine 3 bis 5 cm Abdominalinzision wurde entlang der Mittellinie vorgenommen. Im größten Leberlappen wird eine 1 cm Inzision im hepatischen Parenchym vorgenommen und ein Teil des Leberrands wird entfernt. Eine Konzentration von 1 Million lebenden 9L Gliomatumorzellen (eluiert aus Gewebekultur unmittelbar vor der Prozedur), suspendiert in 100 ml Phosphat-gepufferter Saline, werden auf den geschnittenen Leberrand mit einer 30-Gauge-Nadel abgelegt. Der chirurgische wird dann über dem geschnittenen Leberrand, der die Tumorzellen enthält, platziert und vor Ort mit Gelfoam fixiert. Zwei Tiere erhielten PCL-Filme, die 5 % Taxol enthielten, und zwei Tiere erhielten Filme, die PCL alleine enthielten. Die Abdominalwand wird verschlossen mit 3,0 Dexon und Hautklammern. Die allgemeine Betäubung wird beendet und man erlaubt dem Tier, sich zu erholen. 10 Tage später werden die Tiere getötet und die Lebern histologisch untersucht.

#### B. Ergebnisse

Lokales Tumorstadium wird in den zwei Lebern, die mit Polymer alleine behandelt wurden, beobachtet. Beide Lebern, die mit Polymer plus Taxol behandelt wurden, sind vollständig frei von Tumor, wenn histologisch untersucht. Es ist auch von Bedeutung, daß die Leberkapsel sich regeneriert hatte und vollständig über den Polymerfilm und die Schnittoberfläche der Leber

gewachsen war, was anzeigt, daß es keinen wesentlichen Effekt auf die Wundheilung gibt. Es gibt keinen Beweis lokaler Lebertoxizität die irgendeinen der chirurgischen Filme (Wirkstoff-beladen oder Wirkstoff-frei) umgibt.

#### C. Diskussion

Diese Studie zeigt an, daß chirurgische Filme, die um normale Gewebe und Inzisionsstellen während der Chirurgie plaziert waren, in der Lage sein können, die Inzidenz unabsichtlicher Implantation von Tumorzellen in normales umgebendes Gewebe während Resektion maligner Tumoren zu verringern. Das kann dabei helfen, das Auftreten wesentlicher Probleme postoperativen lokalen Wiederauftretens der Krankheit zu reduzieren.

#### BEISPIEL 19

##### INTRA-ARTIKULÄRE INJEKTION VON ANGIOGENESE-INHIBITOR- BELADENEN BIOLOGISCH ABBAUBAREN MIKROSPHÄREN BEI DER BEHANDLUNG VON ARTHRITIS

Gelenkschaden bei Arthritis beruht auf einer Kombination von Entzündungen (einschließlich WBCs und WBC-Produkten) und Entwicklung von Pannusgewebe (ein Gewebe, das zusammengesetzt ist aus neovaskularem Gewebe, Bindegewebe und entzündlichen Zellen). Taxol ist ausgewählt worden für die ersten Studien, da es ein potenter Inhibitor der Neovaskularisierung ist. Auf diese Weise wird sich Taxol in hohen lokalen Konzentrationen als ein Krankheits-modifizierendes Agens bei Arthritis beweisen.

Um zu bestimmen, ob Mikrosphären einen nachteiligen Effekt auf Gelenke aufweisen, werden die folgenden Experimente durchge-

führt. Kurz gesagt werden einfache PCL- und Taxol-beschichtete Mikrosphären hergestellt, wie oben beschrieben in Beispiel 8.

Drei Kaninchen werden intraartikulär 0,5 bis 5,0  $\mu\text{m}$ , 10 bis 30  $\mu\text{m}$  oder 30 bis 80  $\mu\text{m}$  Mikrosphären in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml (enthaltend 0,5 mg Mikrosphären) injiziert. Die Gelenke werden visuell (klinisch) täglich bewertet. Nach zwei Wochen werden die Tiere getötet und die Gelenke histologisch auf Beweise von Entzündung und Verarmung an Proteoglykanen hin untersucht.

Die entzündliche Arthritis bei Hasen und osteoarthritische Modelle werden verwendet, um die Verwendung von Mikrosphären bei reduzierender Synoviitis und Knorpelabbau zu bewerten. Degenerative Arthritis wird durch teilweises Reißen des Kreuzbandes und des Meniskus des Knies induziert. Nach 4 bis 6 Wochen entwickeln die Kaninchen Erosionen im Knorpel ähnlich den bei menschlicher Osteoarthritis beobachteten. Entzündliche Arthritis wird induziert durch Immunisieren der Kaninchen mit Rinderserumalbumin (BSA) in vollständigem Freundschens Adjuvans (CFA). Nach 3 Wochen erhalten Kaninchen, die einen hohen Titer an anti-BSA-Antikörper enthalten, eine intraartikuläre Injektion von BSA (5 mg). Schwellen des Gelenks und ausgeprägte Synoviitis ist ersichtlich nach 7 Tagen, ein Proteoglykanverlust wird beobachtet nach 7 bis 14 Tagen und Knorpelerosionen werden beobachtet nach 4 bis 6 Wochen.

Entzündliche Arthritis wird induziert, wie oben beschrieben. Nach 4 Tagen werden die Gelenke mit Mikrosphären injiziert, die 5 % Taxol oder Vehikel enthalten. Eine Gruppe von Tieren wird getötet am Tag 14 und eine weitere am Tag 28. Die Gelenke werden histologisch auf Entzündung und Knorpelabbau untersucht. Das Experiment ist konzipiert, um zu bestimmen, ob Taxol-Mikrosphären Gelenkentzündung und Knorpelmatrixabbau beeinflussen können.

Angiogenese-Inhibitor-Mikrosphären können weiter untersucht werden in einem Osteoarthritismodell. Kurz gesagt wird degenerative Arthritis in Kaninchen wie oben beschrieben induziert und die Gelenke erhalten eine intraartikuläre Injektion von Mikrosphären (5 % Taxol oder Vehikel alleine) an Tag 4. Die Tiere werden getötet am Tag 21 und Tag 42 und die Gelenke histologisch auf Belege von Knorpelabbau untersucht.

Studien werden durchgeführt, um Angiogeneseinhibitoren zu bewerten, die über intra-artikulärer Mikrosphären als chondroprotektive Agenzien geliefert werden.

### Ergebnisse

Unbeladene PCL-Mikrosphären verschiedener Größen (0,5 bis 5,0  $\mu\text{m}$ , 10 bis 30  $\mu\text{m}$  oder 30 bis 80  $\mu\text{m}$ ) wurden intra-artikulär in das Kaninchenkniegelenk injiziert. Ergebnisse dieser Experimente sind gezeigt in Fig. 22A bis D. Kurz gesagt ist Fig. 22A eine Fotografie von Synovialmembran von PBS-injizierten Gelenken. Fig. 22B ist eine Fotografie von Gelenken, denen Mikrosphären injiziert wurden. Fig. 22C ist eine Fotografie von Knorpel aus Gelenken, denen man PBS injizierte, und Fig. 22B ist eine Fotografie von Knorpel aus Gelenken, denen Mikrosphären injiziert wurden.

Wie aus diesen Fotografien ersichtlich, gibt es histologisch keinen Unterschied zwischen Gelenken, die eine Mikrosphäreninjektion erhielten und jenen, die keine erhielten. Klinisch betrachtet gab es keinen Beweis für Gelenksentzündung, während der 14 Tage, in denen das Experiment durchgeführt wurde. Als Ganzes gesehen gibt es keinen Beweis für Gelenksentzündung oder Knorpelschaden in Gelenken, wobei Mikrosphären injiziert werden, verglichen mit unbehandelten normalen Gelenken.

### Schlußfolgerungen

Mikrosphären können intra-artikulär injiziert werden, ohne erkennbare Änderungen der Gelenksoberfläche zu verursachen. Dies zeigt an, daß dieses Verfahren ein wirksames Mittel sein kann zum Verabreichen von targetierter, andauernder Freisetzung von Krankheits-modifizierenden Agenzien zu erkrankten Gelenken, während die Toxizität minimiert wird, die mit der systemischen Verabreichung derartiger biologischer Verbindungen verbunden sein könnte.

Wie oben diskutiert, können Mikrosphären in spezifischen Größen mit definierten Wirkstofffreisetzungskinetiken formuliert werden. Es ist auch gezeigt worden, daß Taxol ein potenter Inhibitor für Angiogenese ist, und daß es von Mikrosphären in Mengen freigesetzt wird, die ausreichen, um Neovaskularisierung im CAM-Test zu blockieren. Deshalb sollte eine intra-artikuläre Verabreichung von Angiogenese-Inhibitor-beladenen (z.B. Taxol-beladenen) Mikrosphären in der Lage sein, die Neovaskularisierung zu blockieren, die bei Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis auftritt und zur Knorpelzerstörung im Gelenk führt. Auf diese Weise können die Wirkstoff-beladenen Mikrosphären als ein "chondroprotektives" Agens wirken, das den Knorpel vor irreversibler Zerstörung durch eindringendes neovaskuläres Pannusgewebe schützt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN

- (i) ANMELDER: Hunter, William L.  
Machan, Lindsay S.  
Arsenault, A. Larry  
Burt, Helen M.
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Anti-angiogene Zusammen-  
setzungen und Verfahren zur Verwendung
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 1
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
  - (A) ADRESSE: SEED and BERRY
  - (B) STRASSE: 701 Fifth Avenue, 6300 Columbia Center
  - (C) STADT: Seattle
  - (D) STAAT: Washington
  - (E) LAND: USA
  - (F) POSTLEITZAHL: 98104
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Diskette
  - (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DERZEITIGE ANMELDEDATEN:
  - (A) ANMELDENUMMER:
  - (B) ANMELDETAG:
  - (C) KLASSIFIZIERUNG:
- (viii) ANGABEN BETREFFEND ANWALT/AGENTEN:
  - (A) NAME: McMasters, David D.
  - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33,963
  - (C) REFERENZ-/PROZESSLISTENNUMMER: 110129.401
- (xi) ANGABEN BETREFFEND TELEKOMMUNIKATION:
  - (A) TELEFON: (206) 622-4900
  - (B) TELEFAX: (206) 682-6031
  - (C) TELEX: 3723836

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1:

Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg  
1 5

Ansprüche

1. Eine Endoprothese zum Erweitern des Lumens eines Körperdurchganges, welche eine im allgemeinen röhrenförmige Struktur umfaßt, die mit einer Zusammensetzung beschichtet ist, die einen anti-angiogenen Faktor und einen polymeren Träger umfaßt.
2. Eine Endoprothese nach Anspruch 1, wobei der anti-angiogene Faktor ein chemotherapeutisches Agens ist.
3. Eine Endoprothese nach Anspruch 1, wobei der anti-angiogene Faktor ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Estramustin und Methotrexat besteht.
4. Eine Endoprothese nach Anspruch 1, wobei der anti-angiogene Faktor Taxol ist, oder ein Analog oder Derivat davon.
5. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der polymere Träger Poly-(Caprolacton) umfaßt.
6. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der polymere Träger Poly-(Milchsäure) umfaßt.
7. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der polymere Träger Poly-(Ethylen-Vinylacetat) umfaßt.
8. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der polymere Träger ein Copolymer von Polycaprolacton und Polymilchsäure umfaßt.



9. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Endoprothese eine Vaskularendoprothese ist.
10. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Endoprothese eine Gallenendoprothese ist.
11. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Endoprothese eine Harnröhrenendoprothese ist.
12. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Endoprothes eine Ösophagusendoprothese ist.
13. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Endoprothese eine Trachial-/Bronchialendoprothese ist.
14. Eine Endoprothese nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Behandeln des Verengungsvorganges eines Körperdurchgangs.
15. Eine Endoprothese nach Anspruch 14 zum Behandeln oder Verhindern rezidivierender Stenose.
16. Verwendung einer Zusammensetzung, die einen anti-angiogenen Faktor umfaßt für die Herstellung eines Medikaments zum Behandeln von Arthritis.
17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der anti-angiogene Faktor Taxol ist, oder ein Analog oder Derivat davon.
18. Verwendung nach den Ansprüchen 16 oder 17, wobei der anti-angiogene Faktor weiter einen polymeren Träger umfaßt.
19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der polymere Träger Poly-(Caprolacton) umfaßt.

20. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der polymere Träger Poly-(Milchsäure) umfaßt.
21. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der polymere Träger Poly-(Ethylen-Vinylacetat) umfaßt.
22. Verwendung nach Anspruch 18, wobei der polymere Träger Poly-(Milch--Co-Glycol-) Säure umfaßt.
23. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 22, wobei die Arthritis entzündliche Arthritis ist.
24. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 23, wobei die Arthritis durch intra-artikuläre Verabreichung des Medikaments behandelt wird.
25. Verwendung einer Zusammensetzung, die einen anti-angiogenen Faktor und einen polymeren Träger umfaßt zum Beschichten einer Endoprothese nach einem jeden der Ansprüche 1 bis 15.
26. Verwendung von Taxol, oder einem Analog oder Derivat davon, zur Herstellung eines Medikaments für Anti-Angiogenese.
27. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Medikament zum Behandeln von Schuppenflechte ist.
28. Verwendung nach Anspruch 26, wobei das Medikament zur Behandlung vaskulärer Adhäsionen ist.
29. Eine Endoprothese nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der polymere Träger Gelatine umfaßt.

EP 94 920 360.8  
A2831

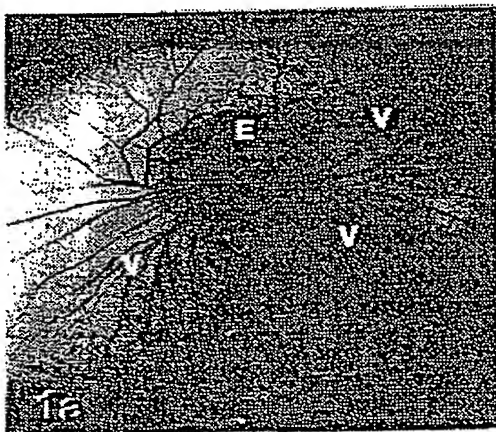


FIG. 1A



FIG. 1B

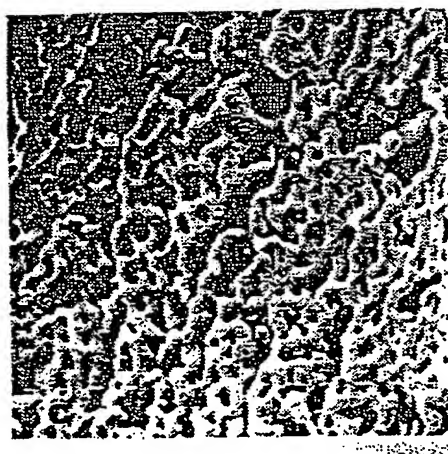
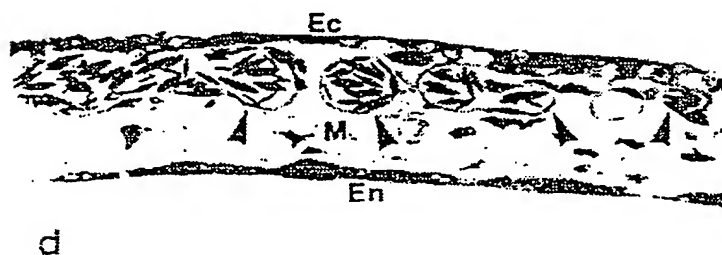


FIG. 1C

FIG. 1D



d

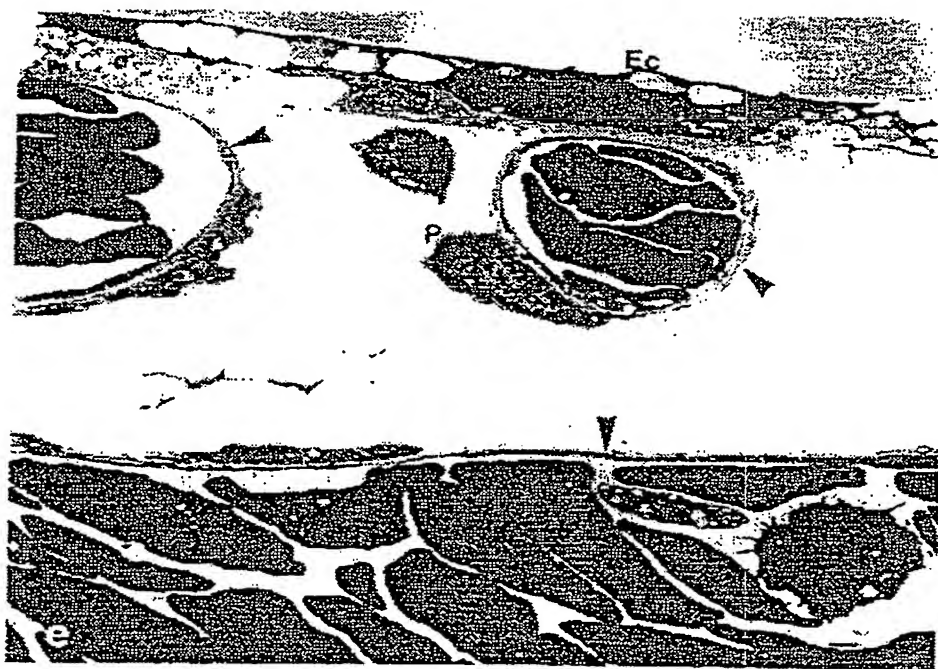


FIG. 1E



FIG. 2A

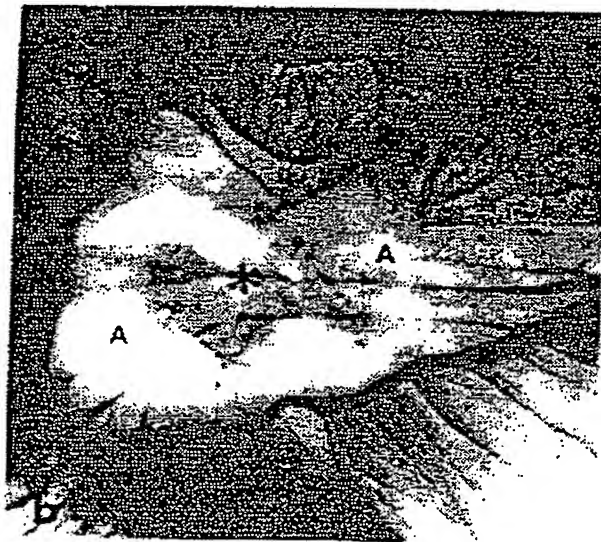


FIG. 2B

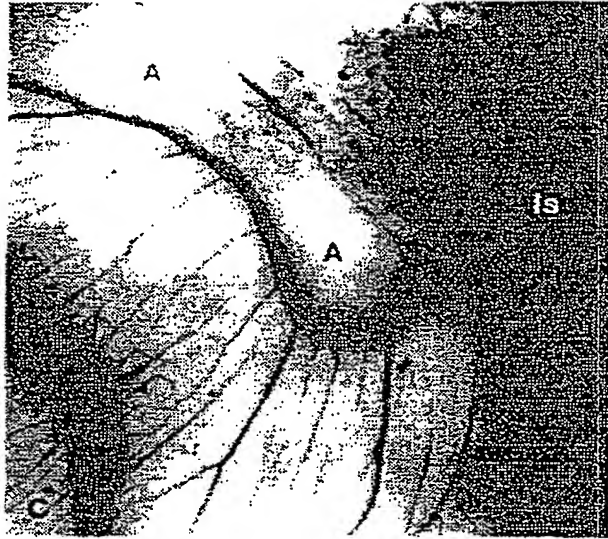


FIG. 2C

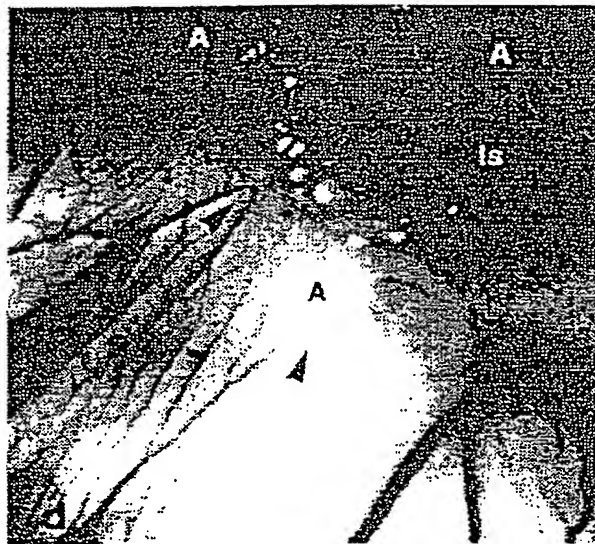


FIG. 2D

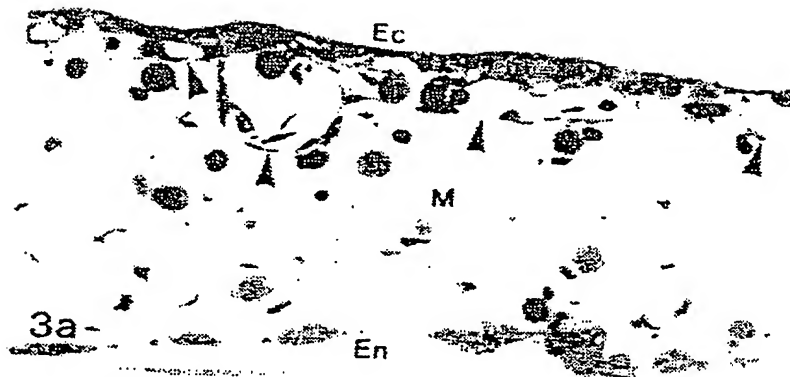


FIG. 3A



FIG. 3B

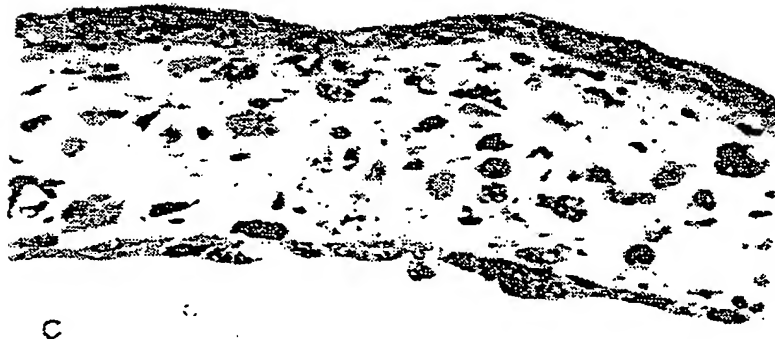


FIG. 3C

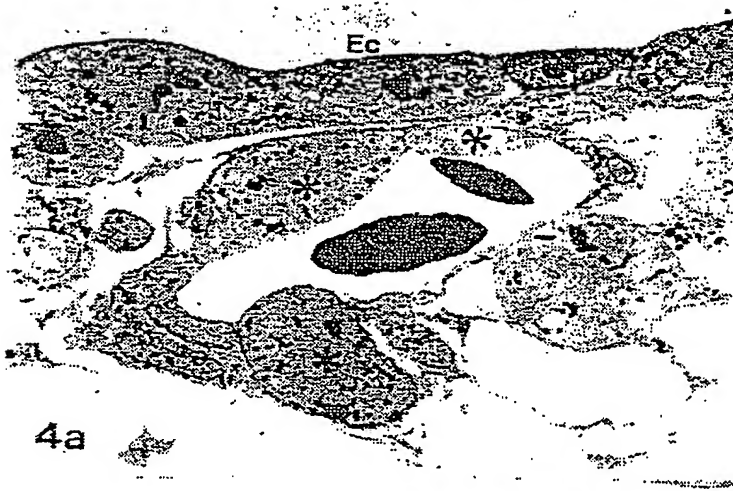


FIG. 4A

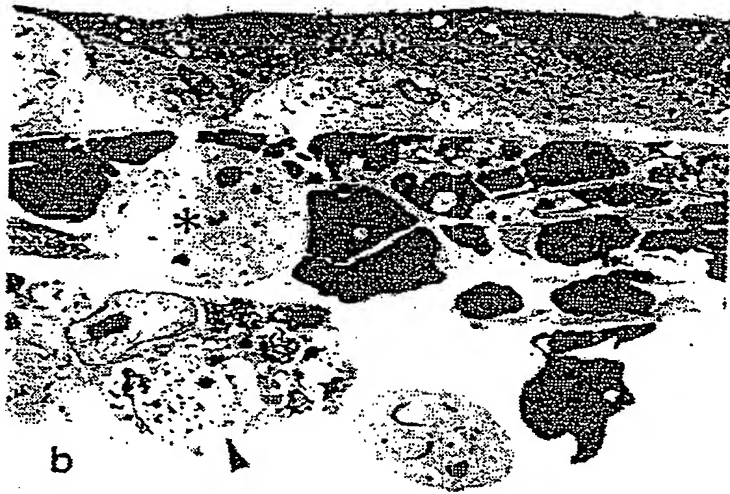


FIG. 4B

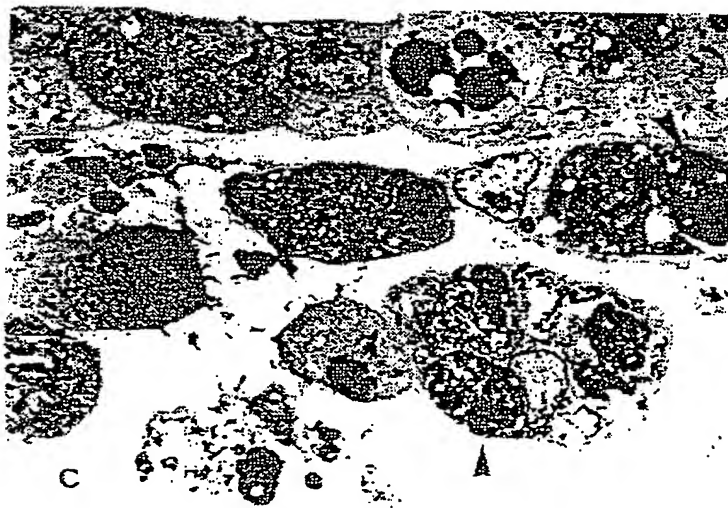
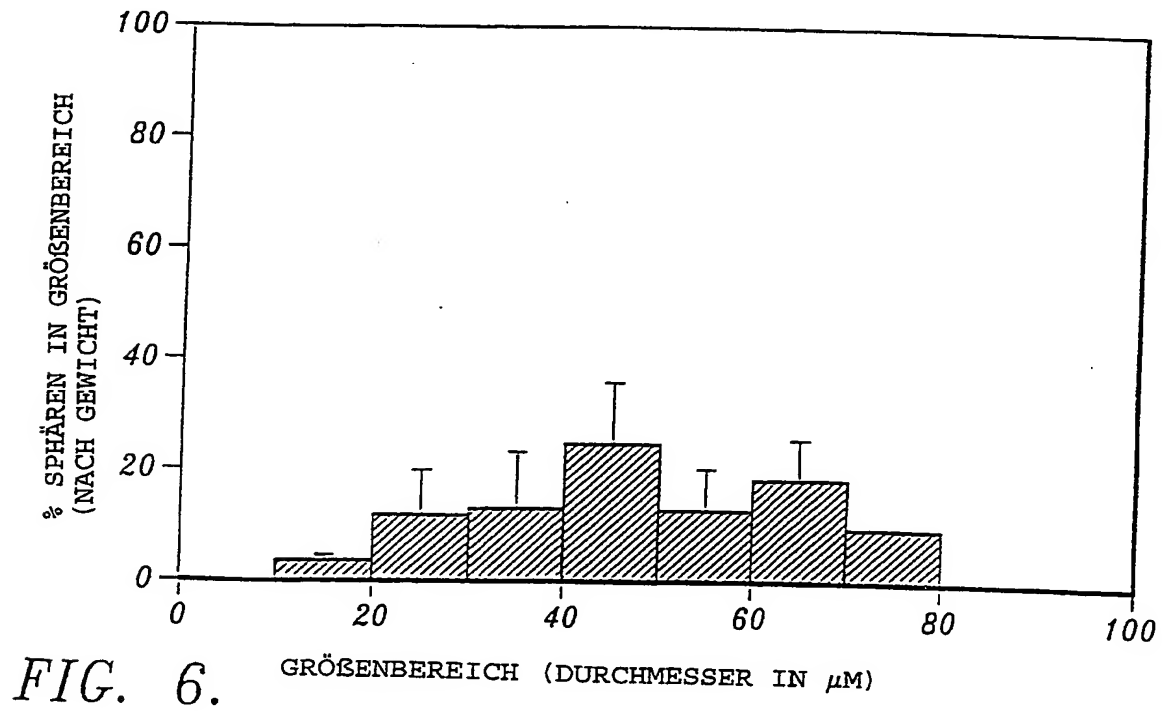
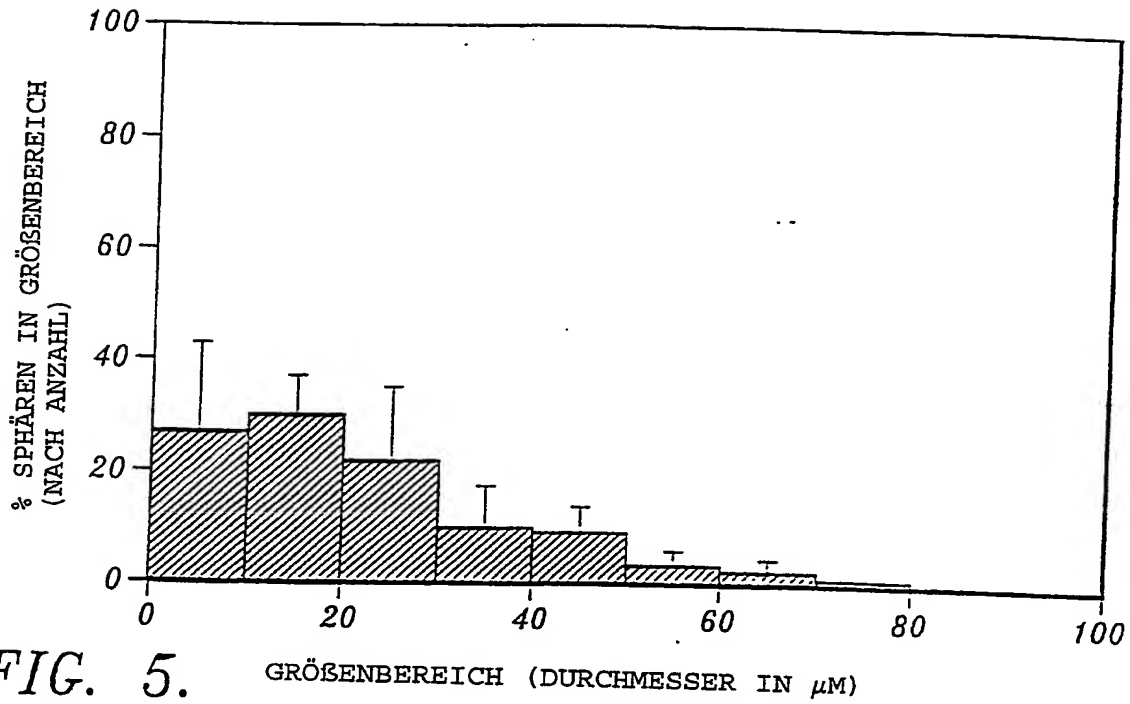


FIG. 4C





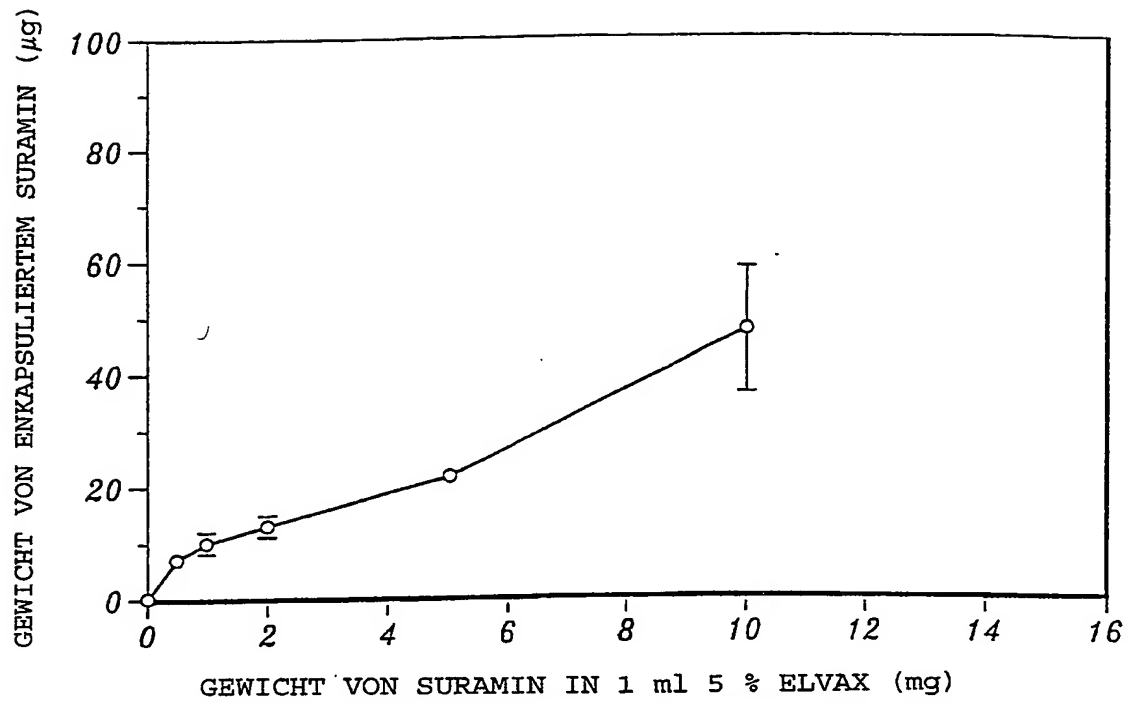


FIG. 7.

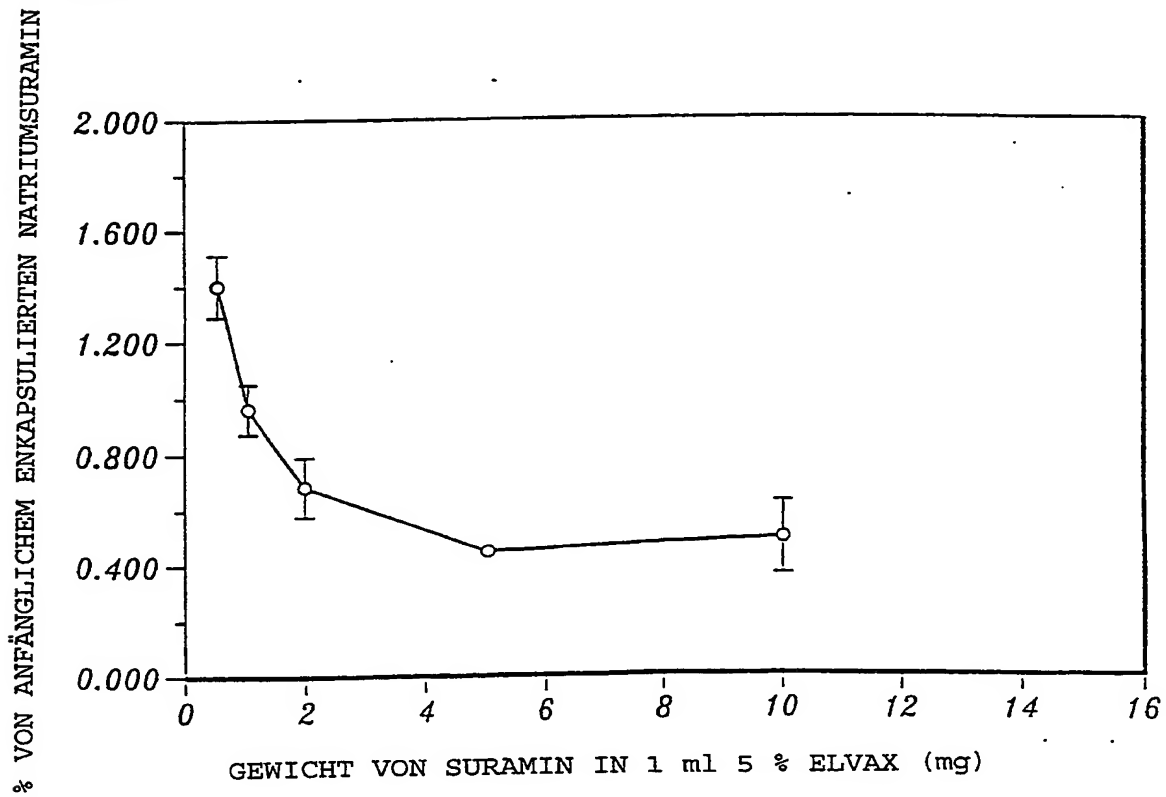


FIG. 8.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

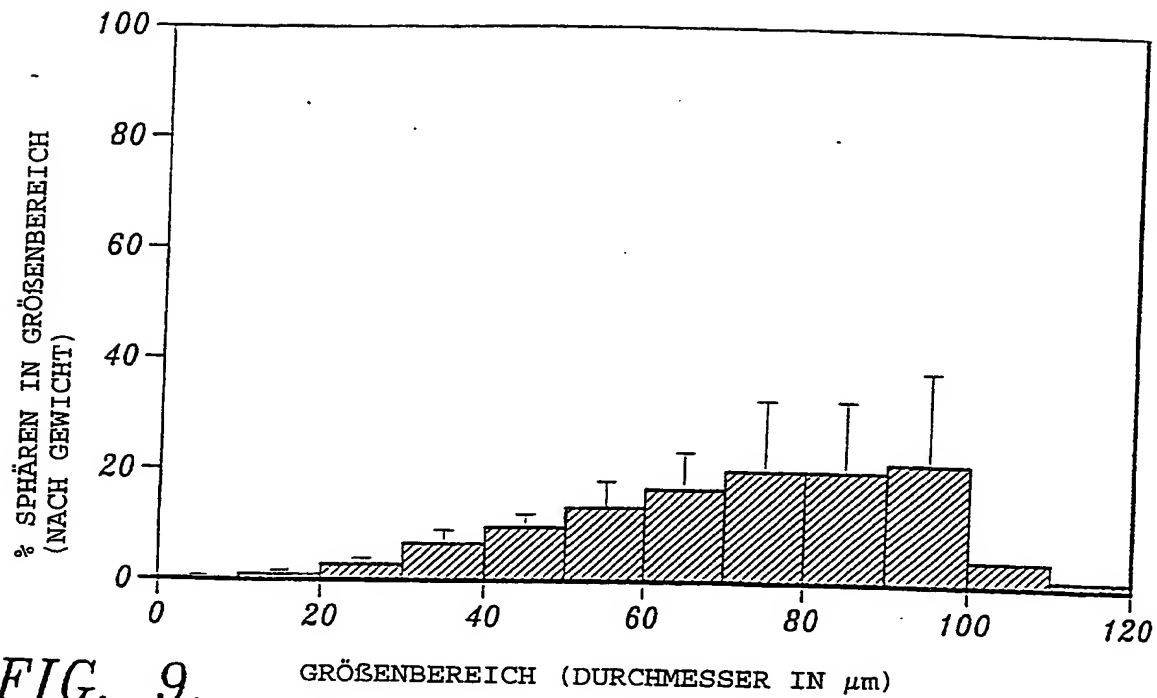


FIG. 9.

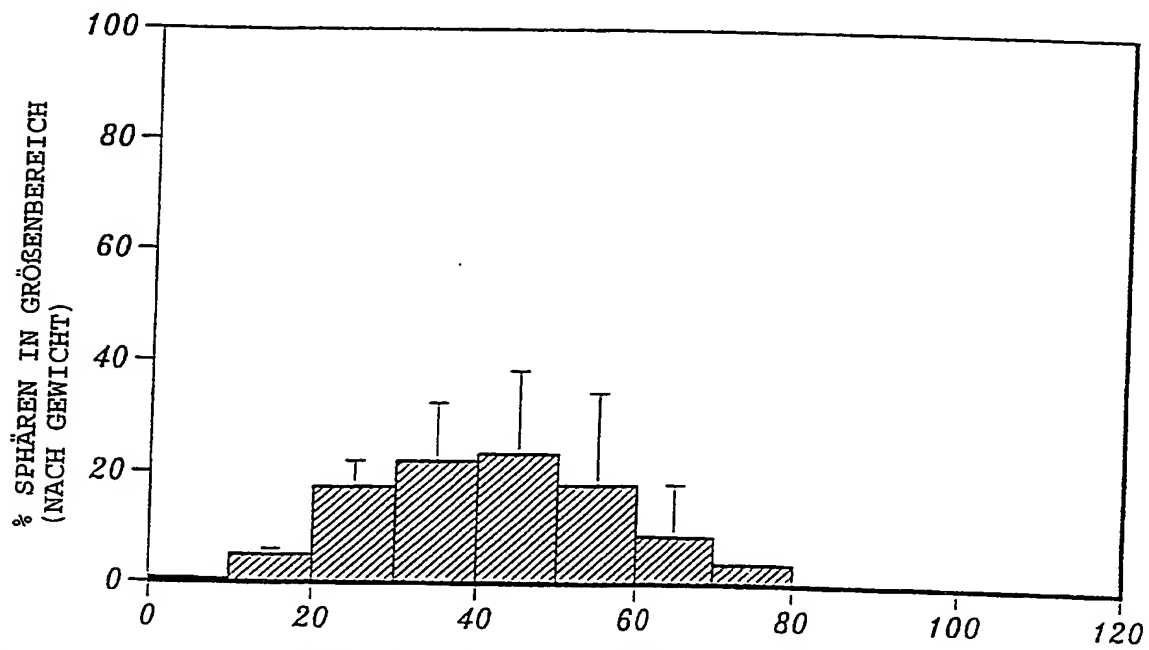


FIG. 10.

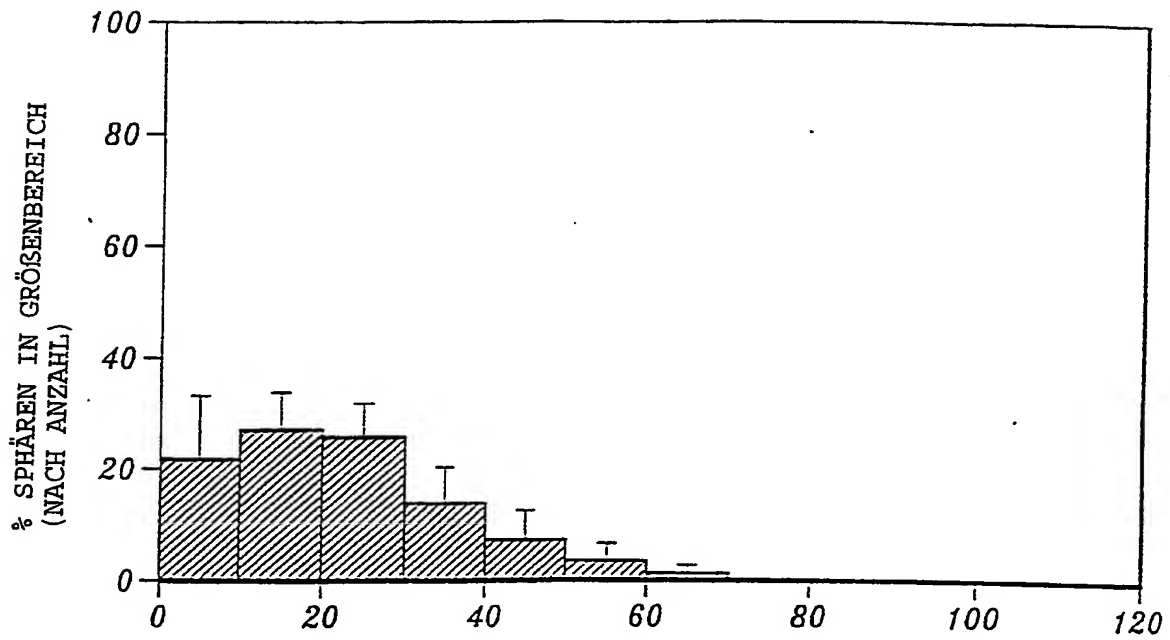


FIG. 11. GRÖßENBEREICH (DURCHMESSER IN  $\mu\text{m}$ )

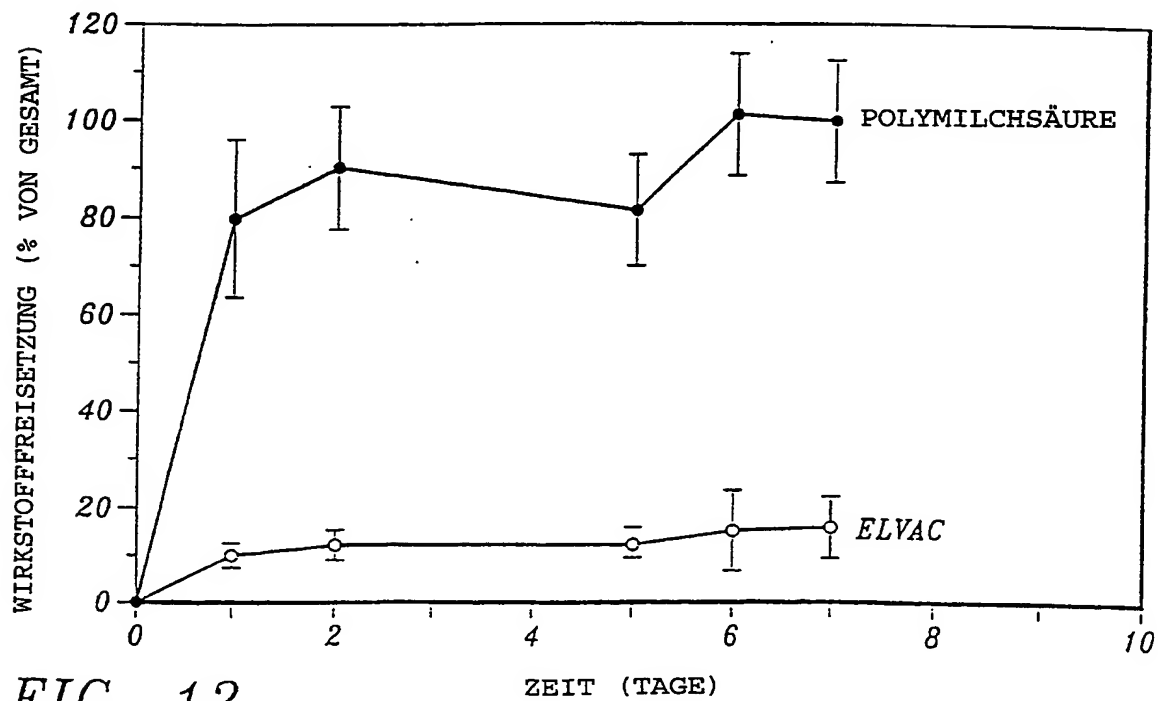


FIG. 12.

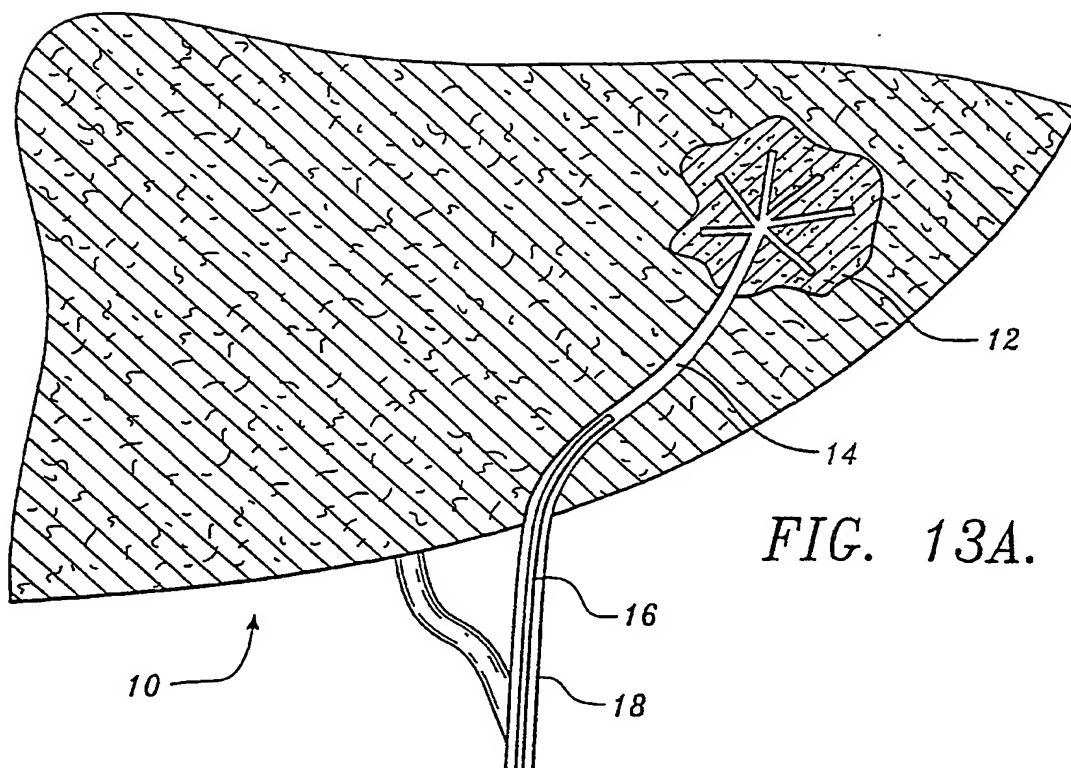


FIG. 13A.

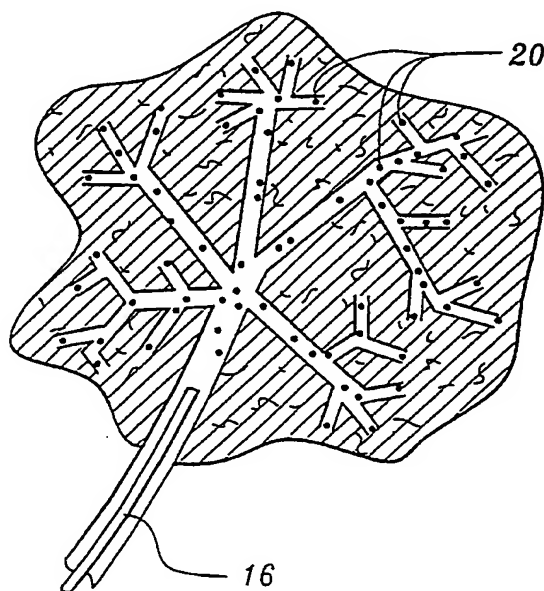
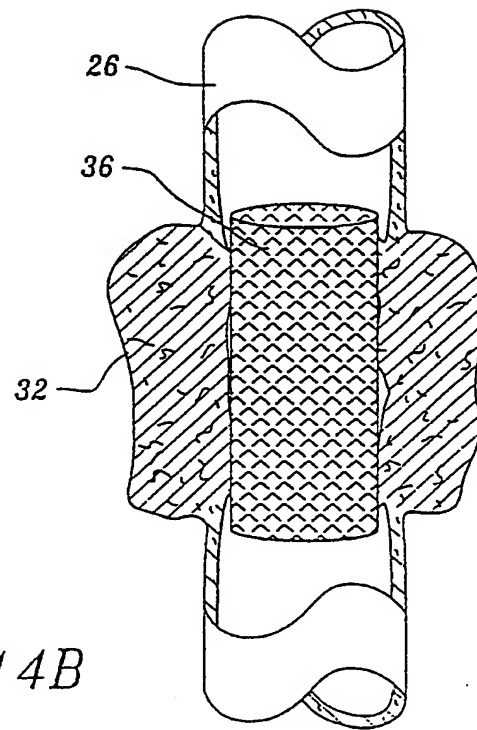
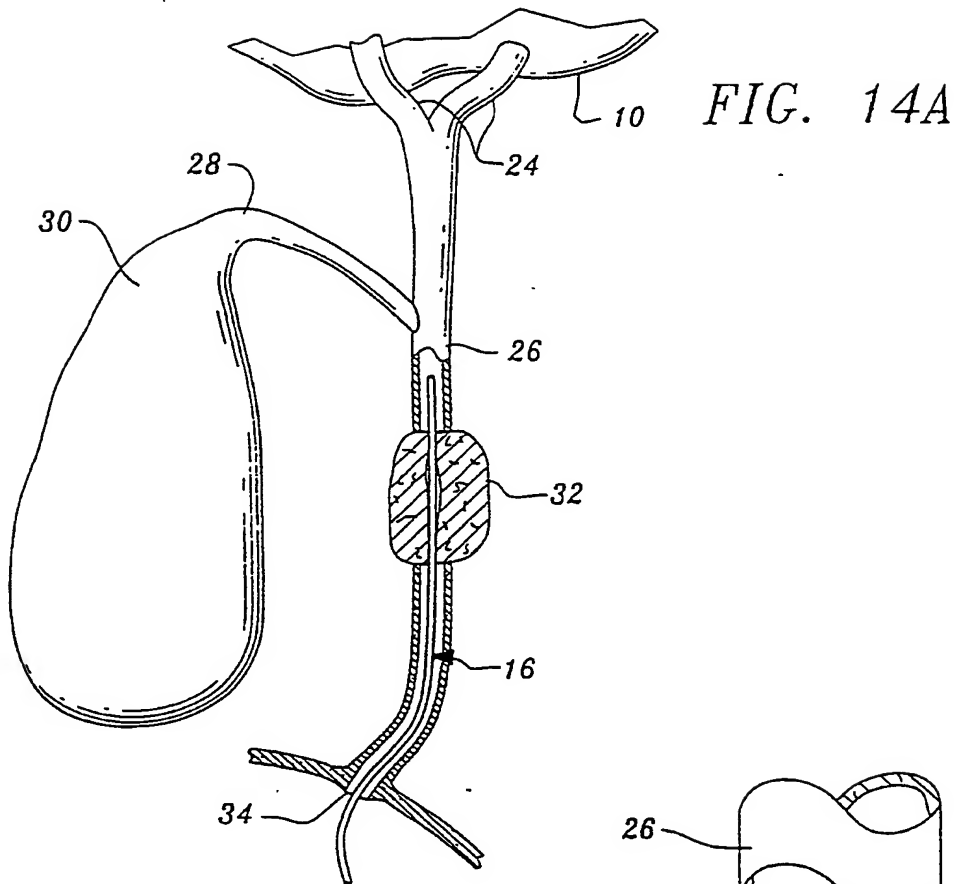
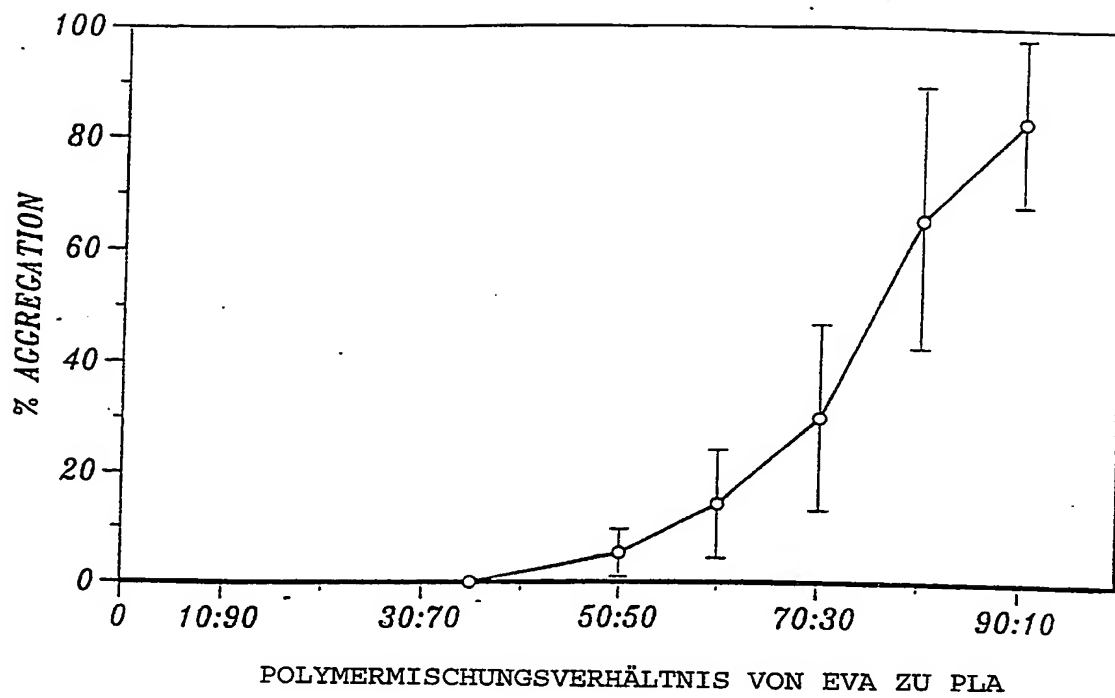


FIG. 13B.



*FIG. 15A.*



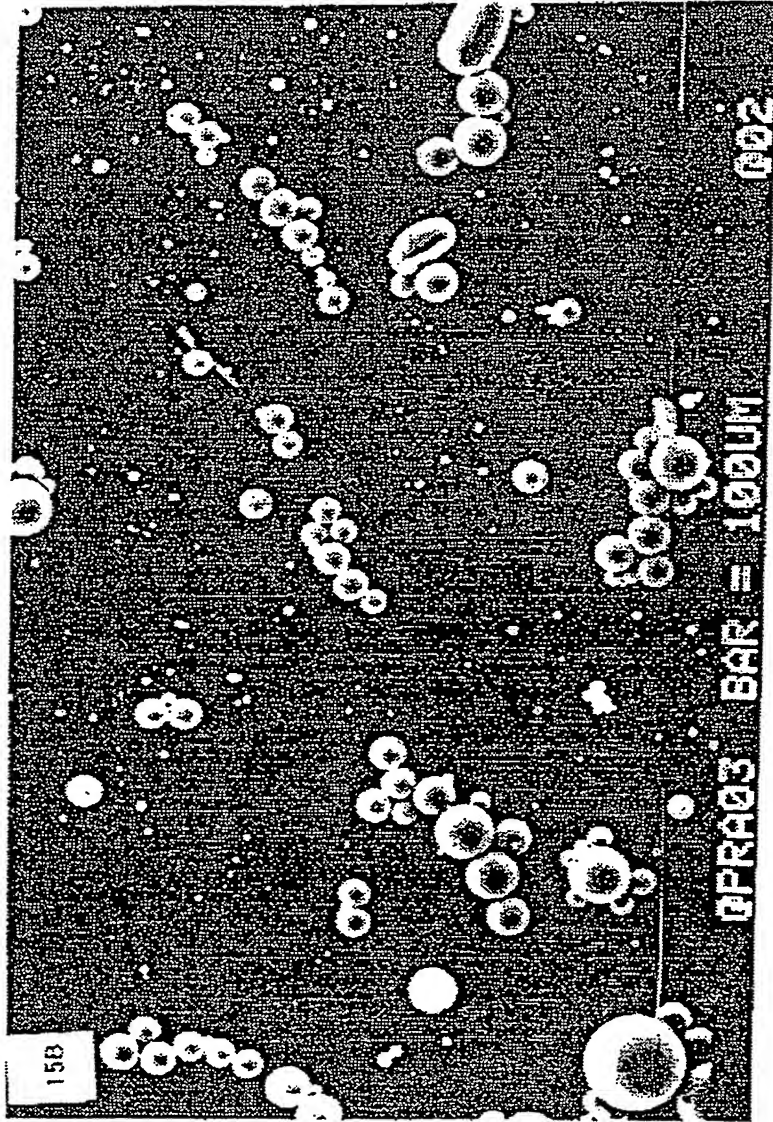


FIG. 15B

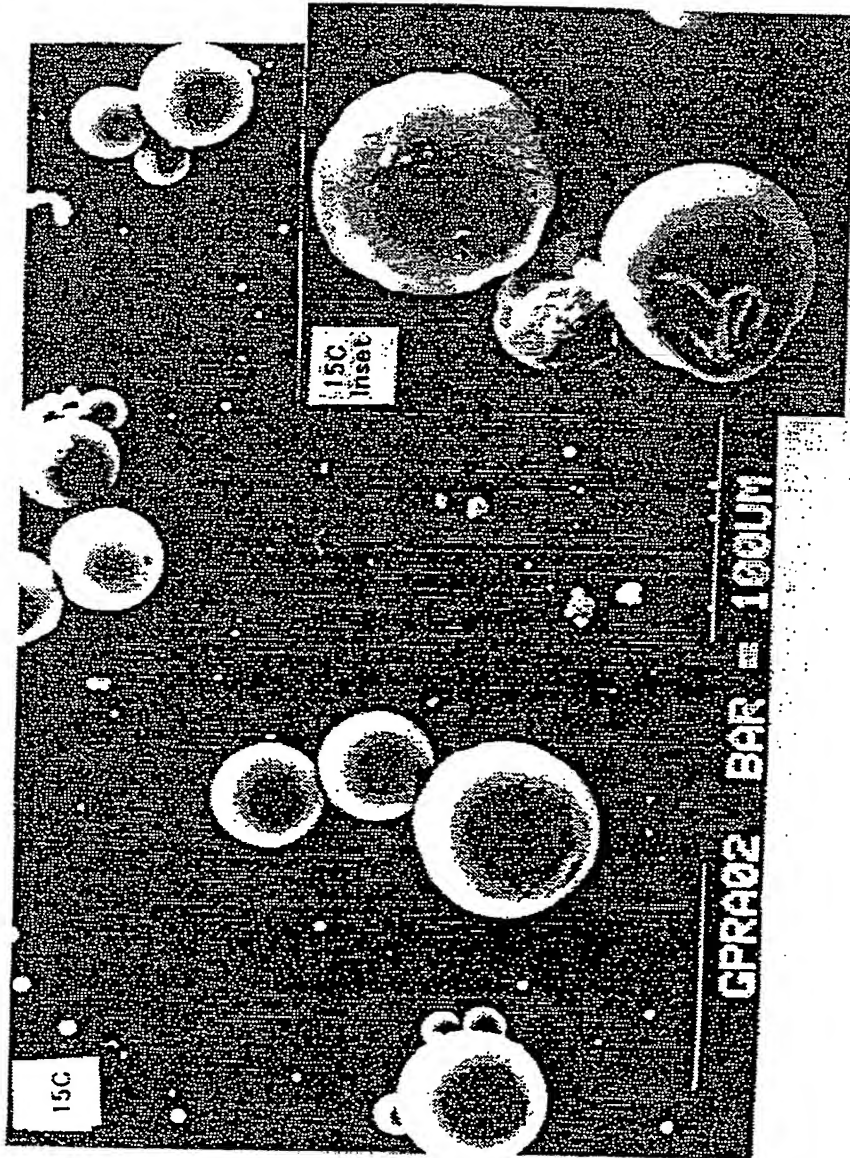
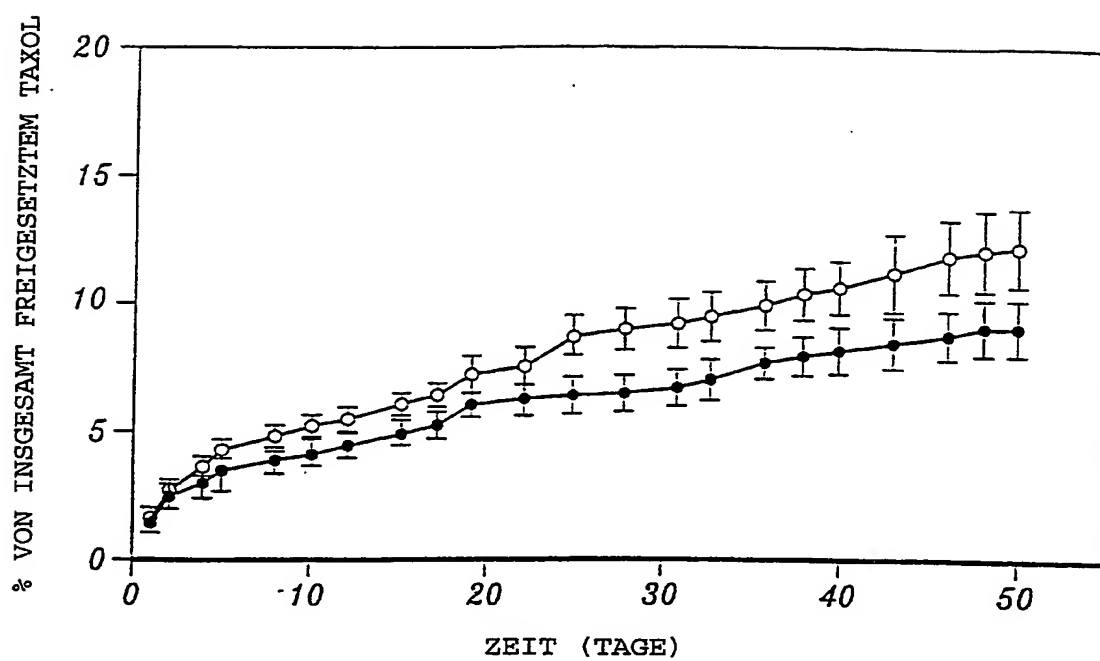


FIG. 15C

*FIG. 15D.*

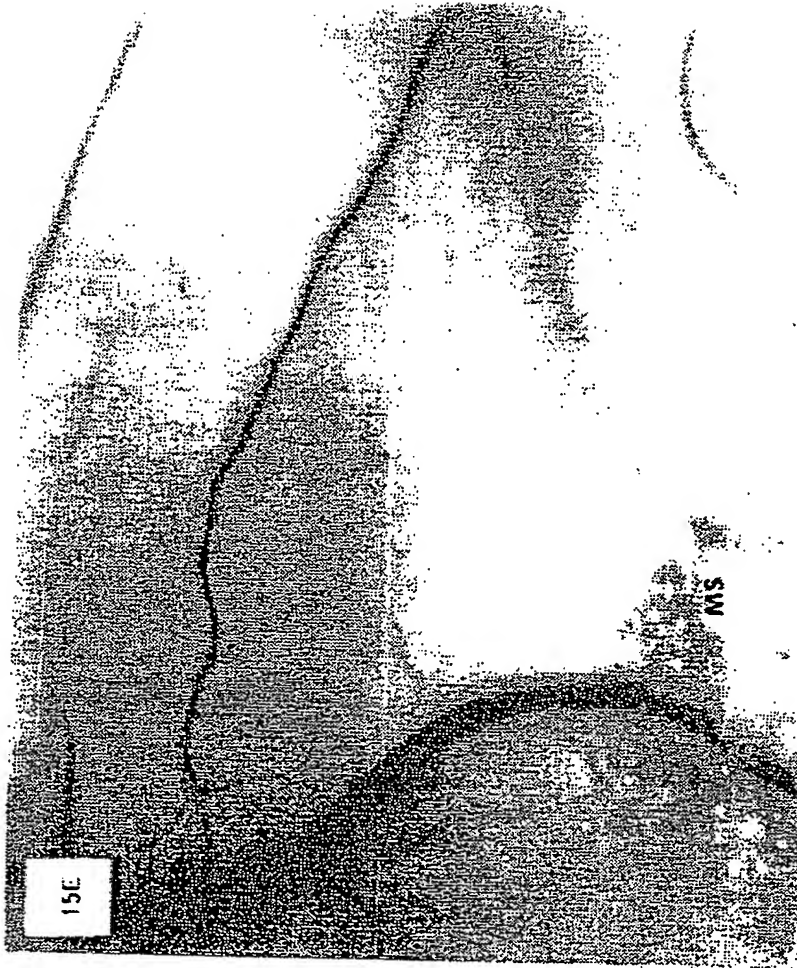
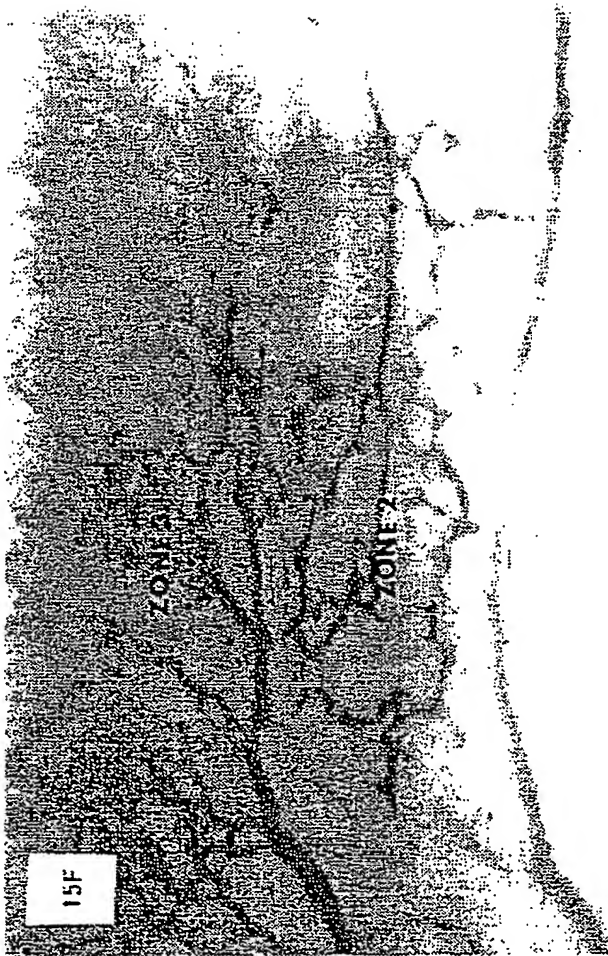


FIG. 15E



ZONE 1

MS

FIG. 15F

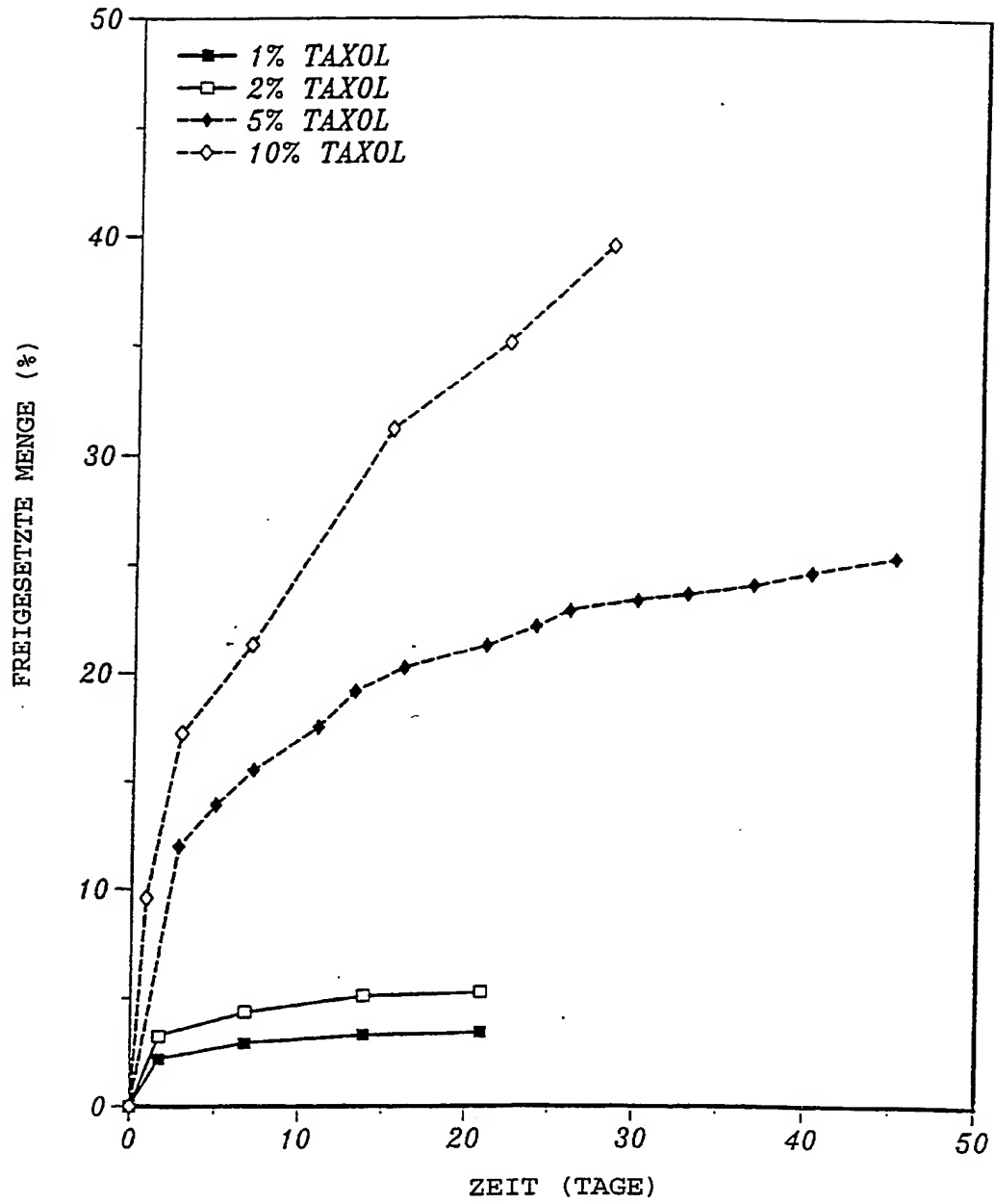
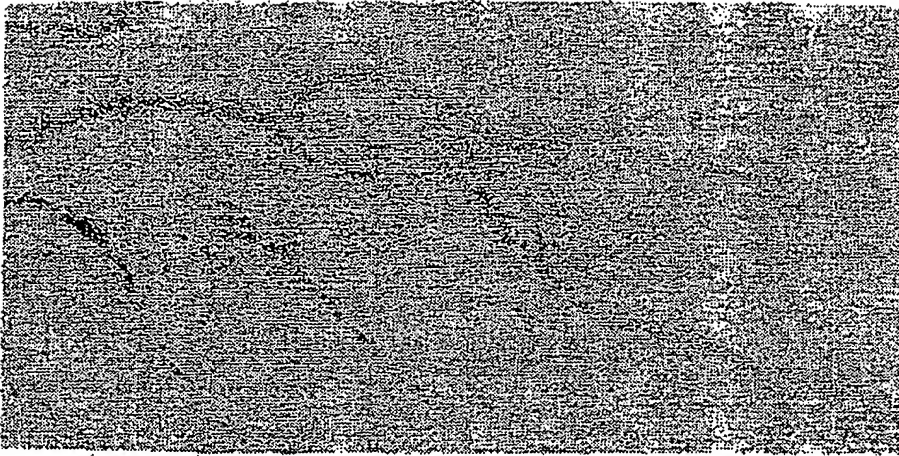
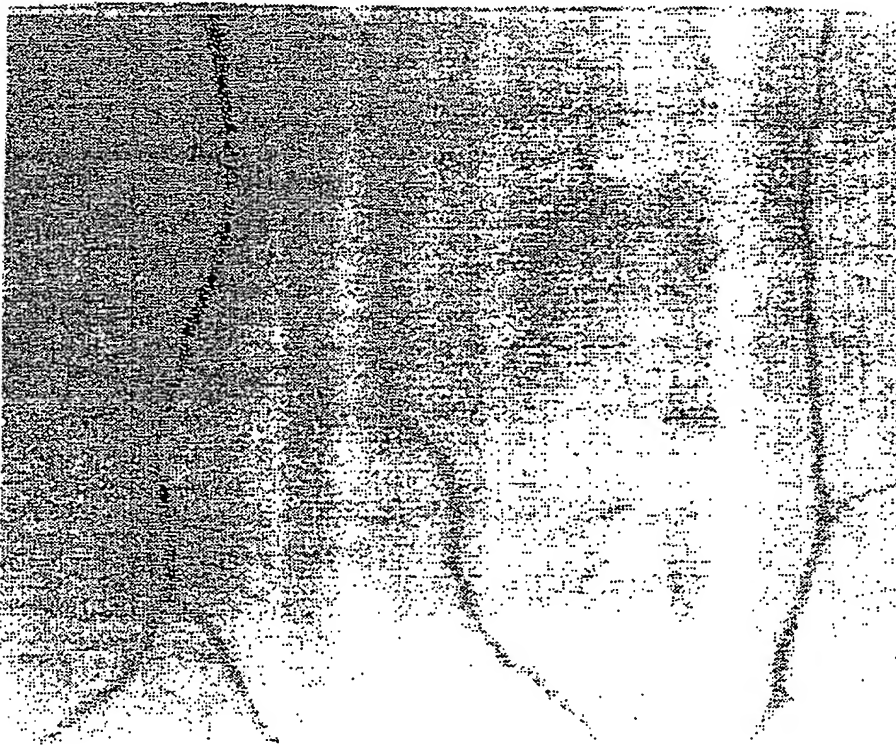


FIG. 16A.



*FIG. 16B*



*FIG. 16C*

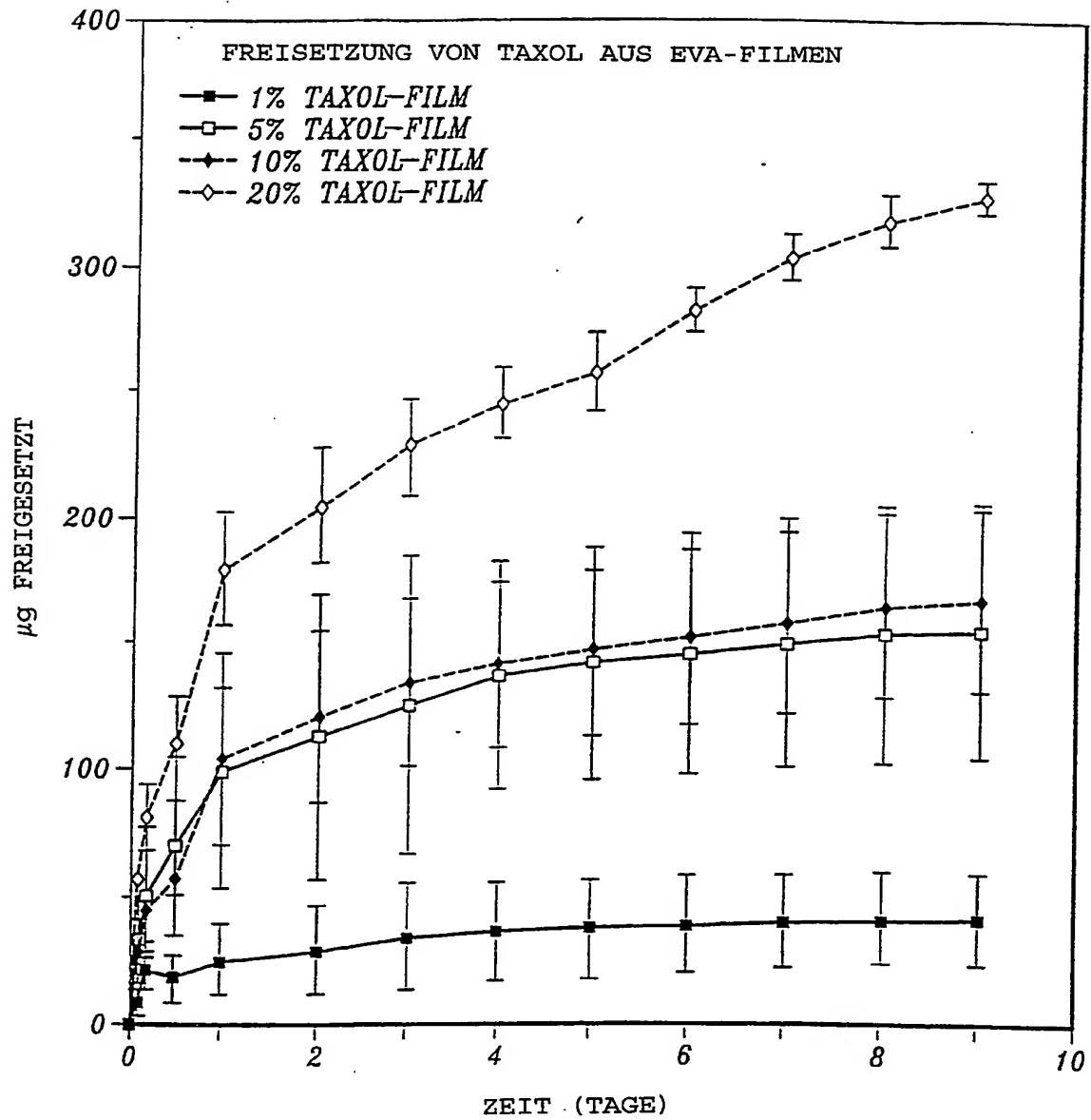


FIG. 17A.



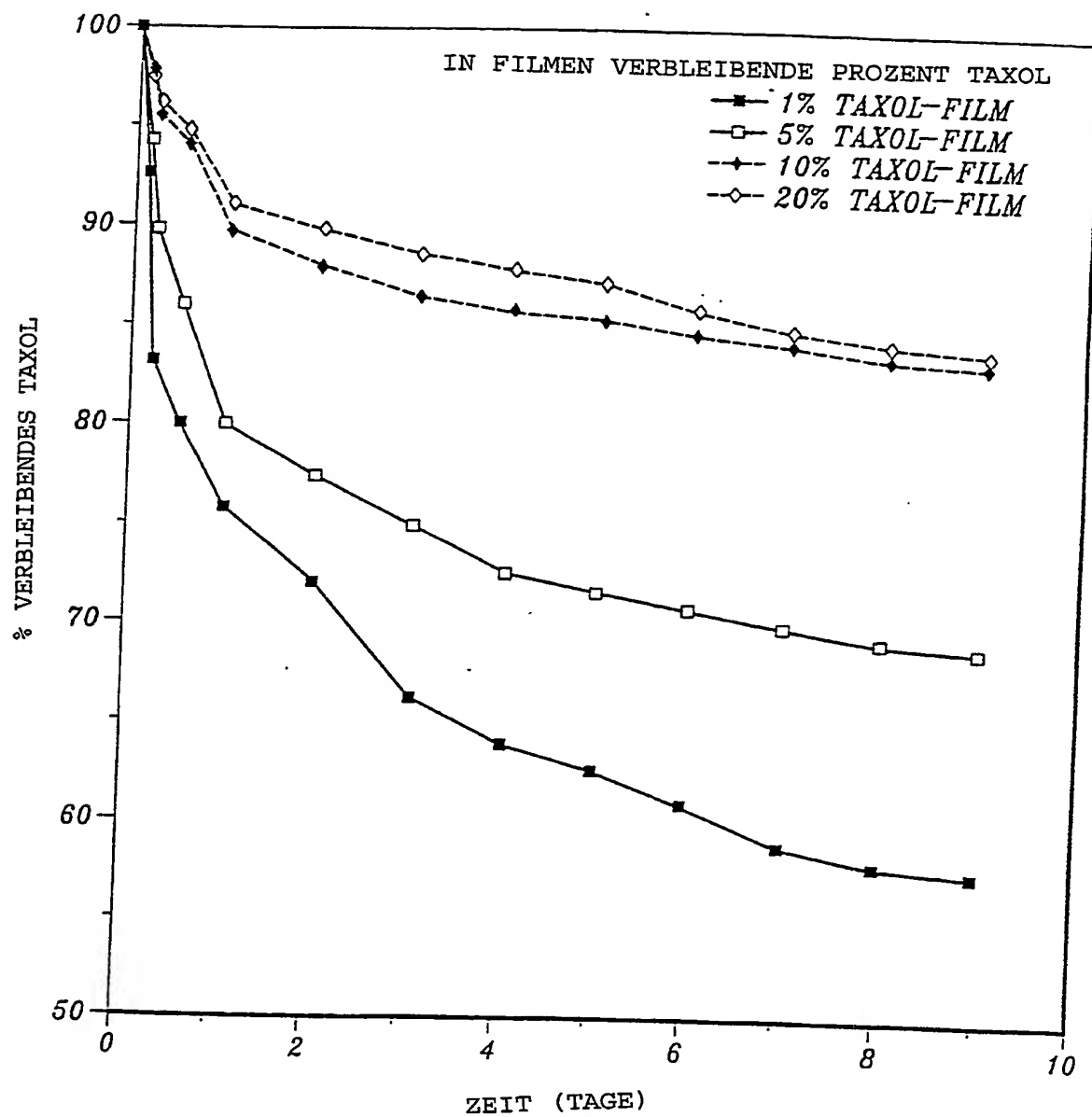


FIG. 17B.

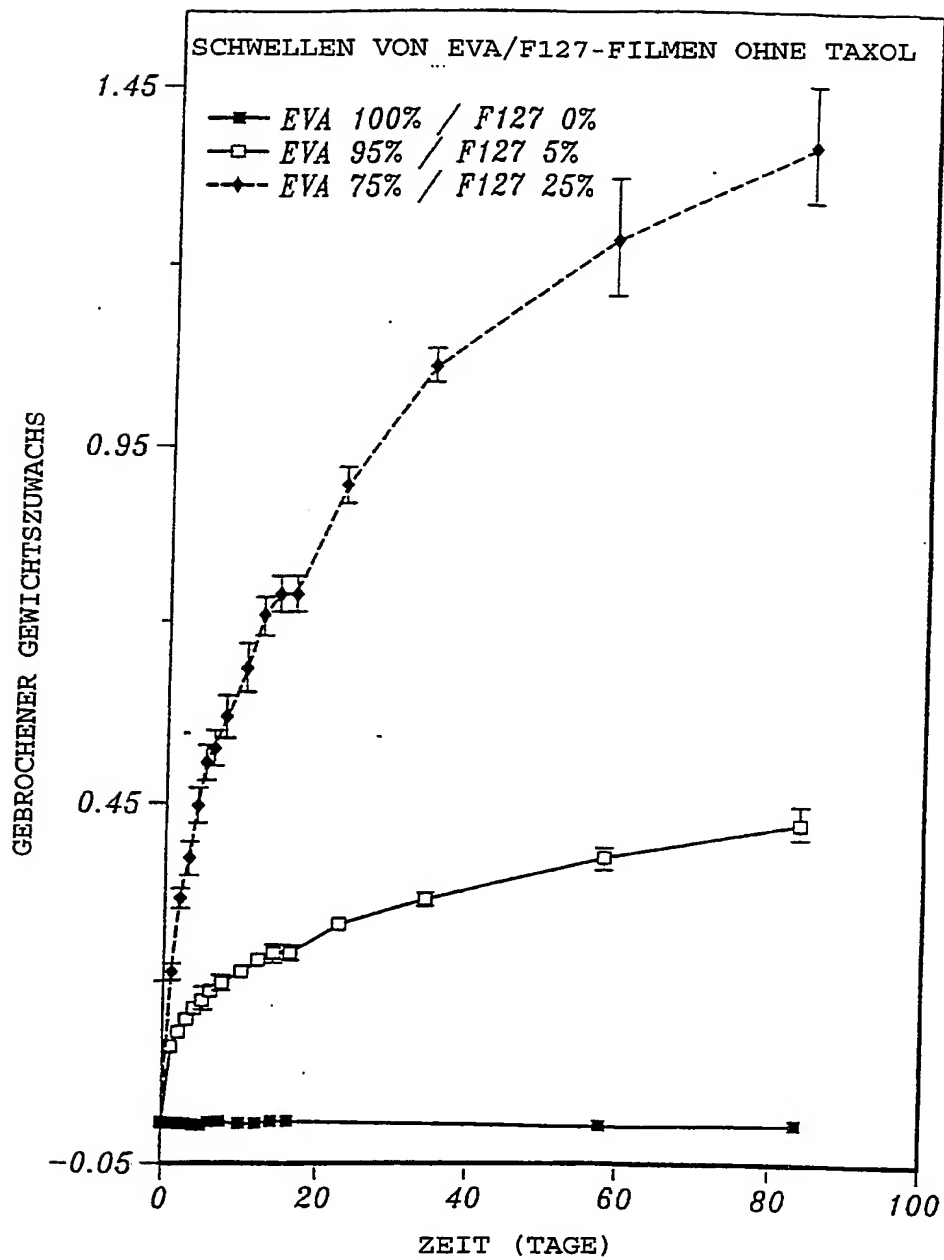


FIG. 17C.

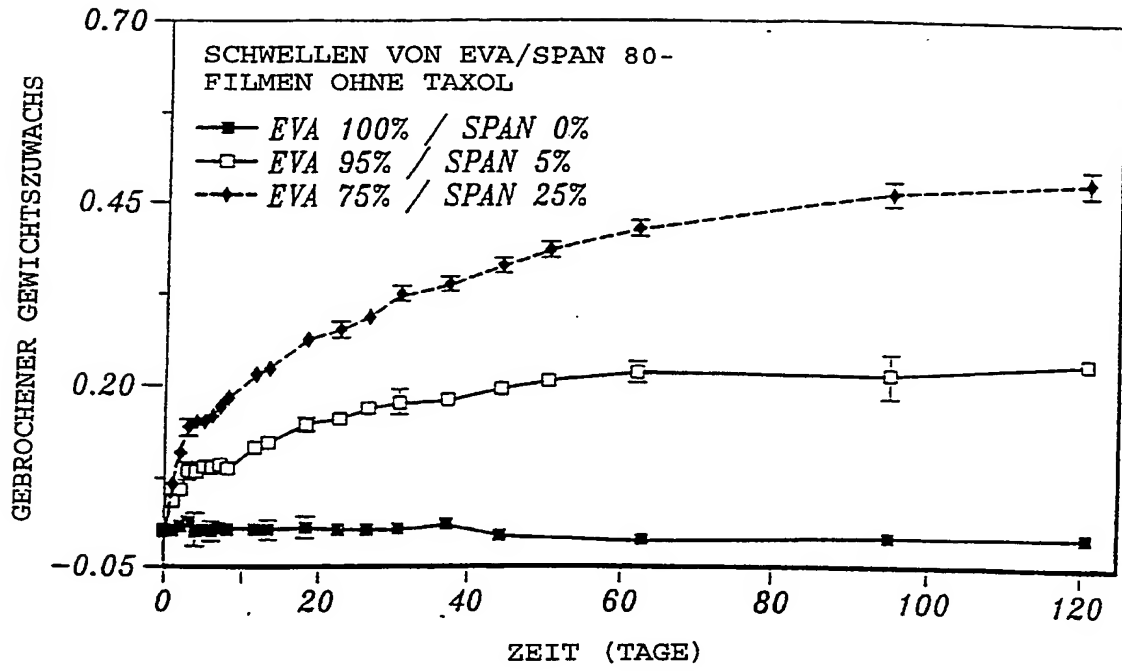


FIG. 17D.

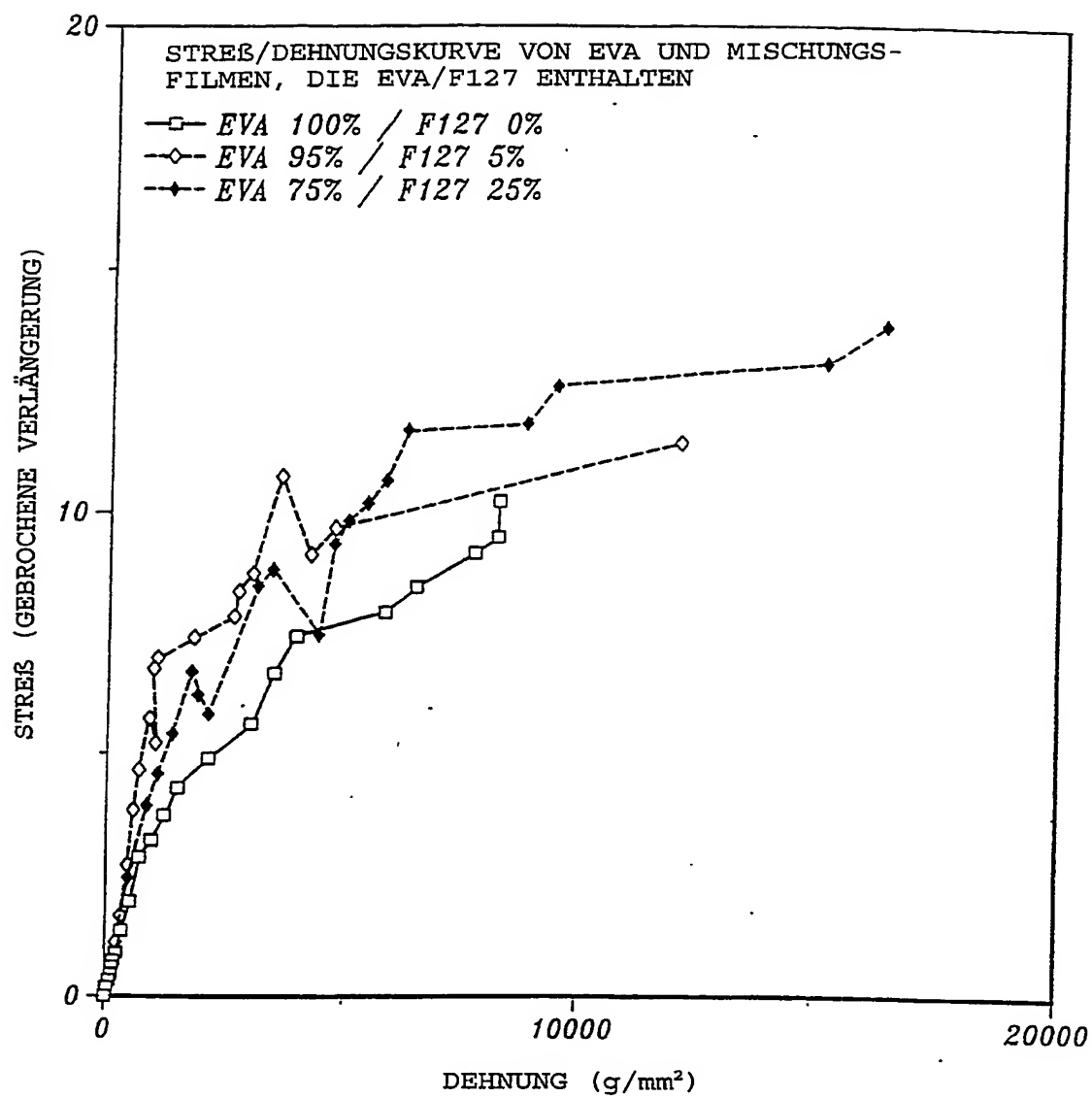


FIG. 17E.

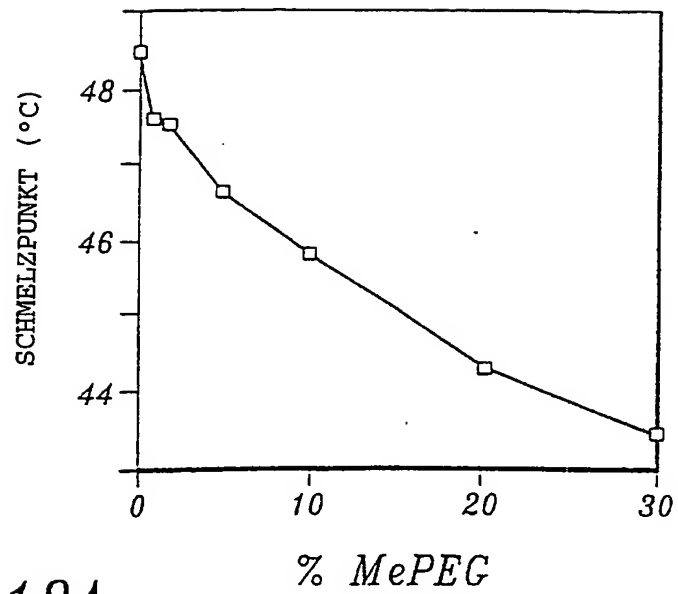


FIG. 18A.

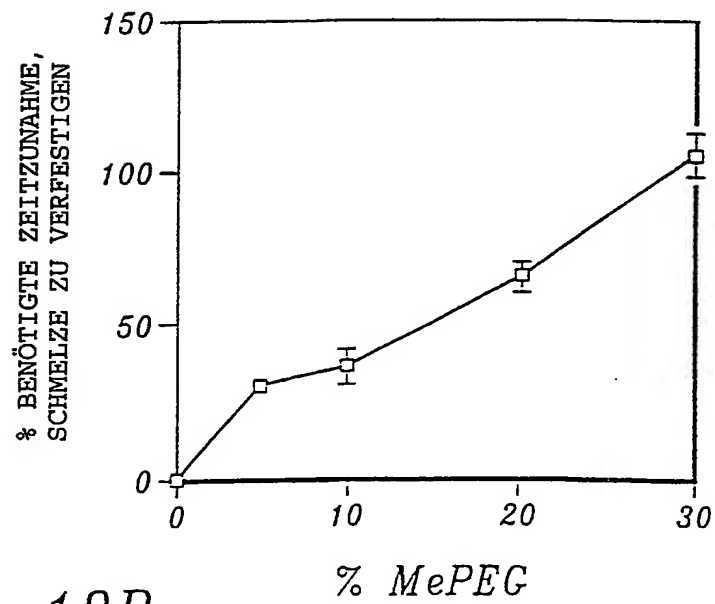


FIG. 18B.

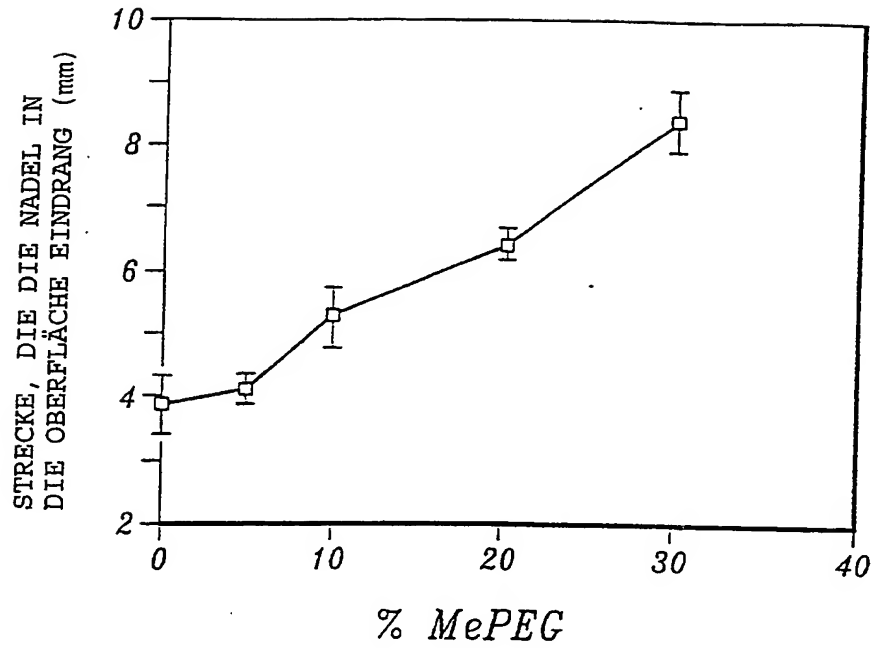


FIG. 18C.

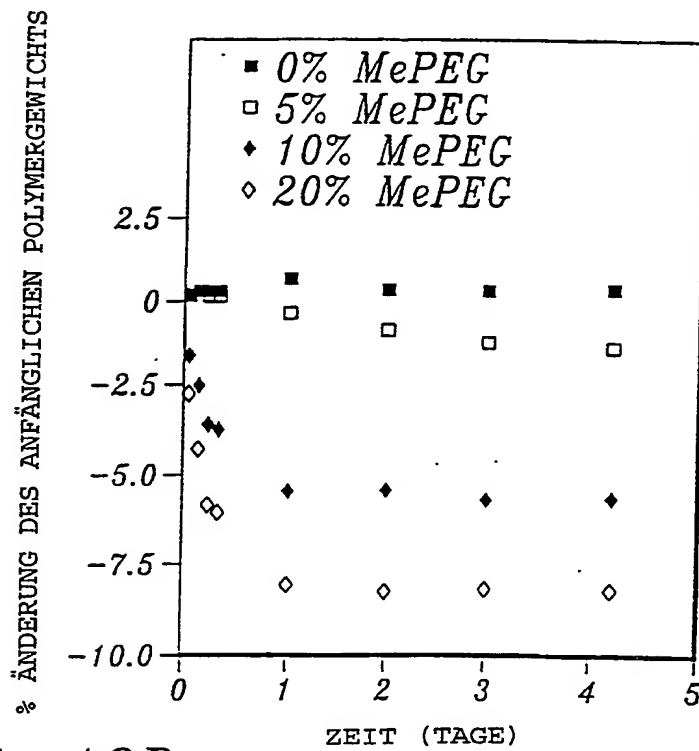


FIG. 18D.

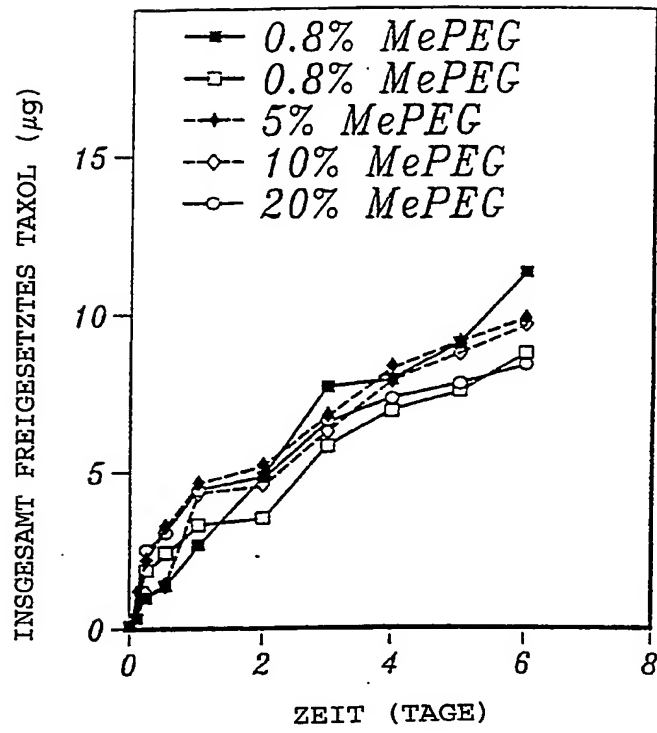


FIG. 18E.

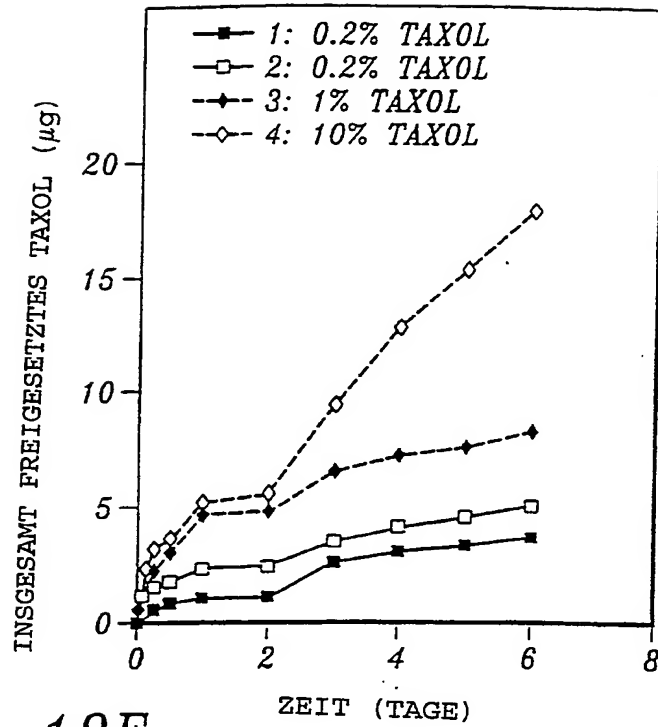


FIG. 18F.

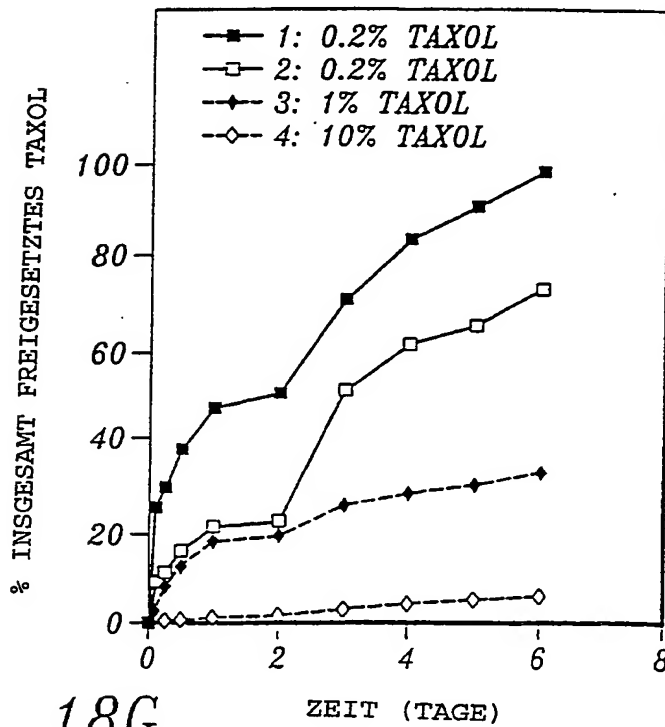


FIG. 18G.



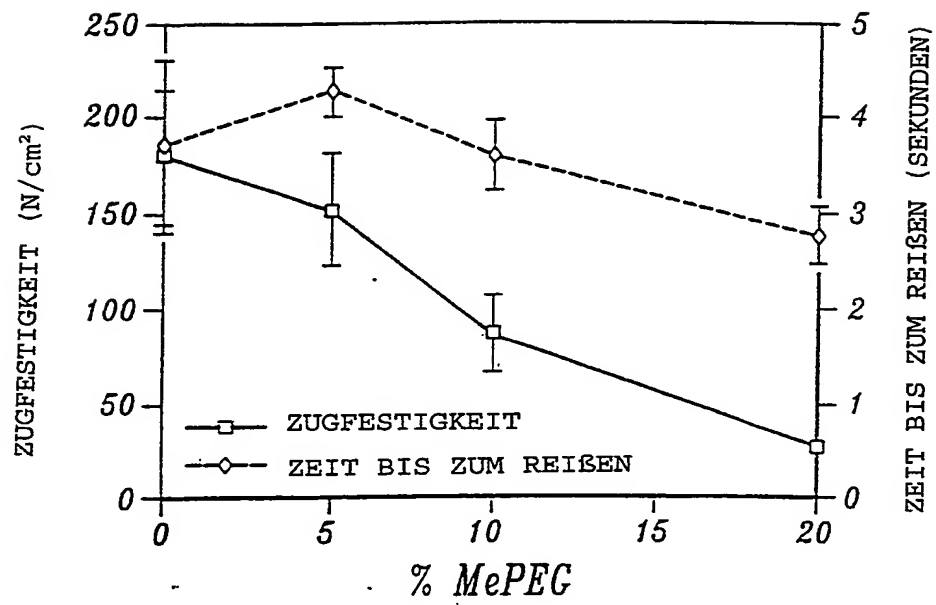


FIG. 18H.



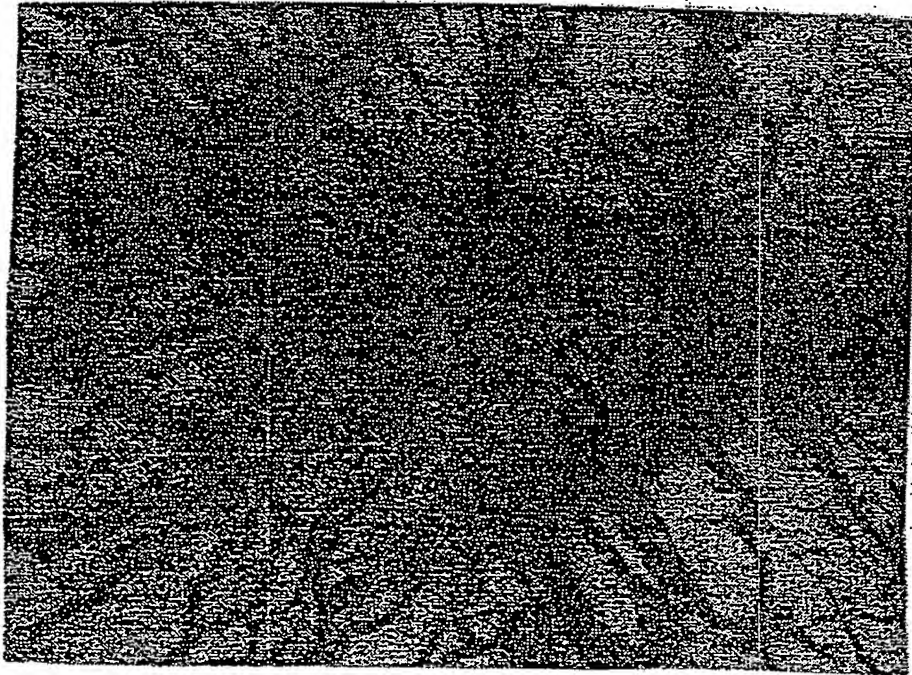
*FIG. 19A*



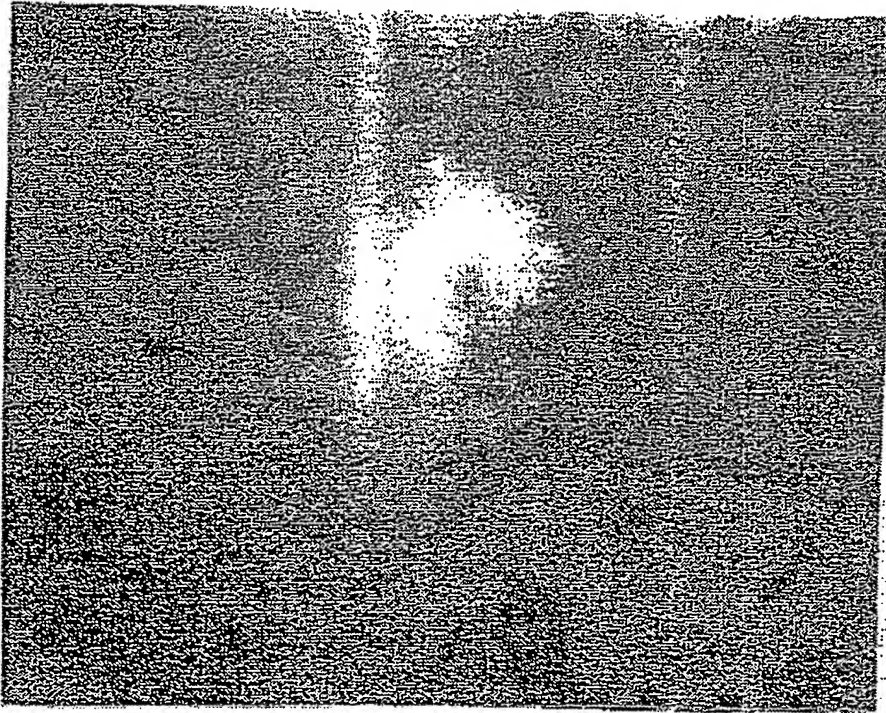
*FIG. 19B*



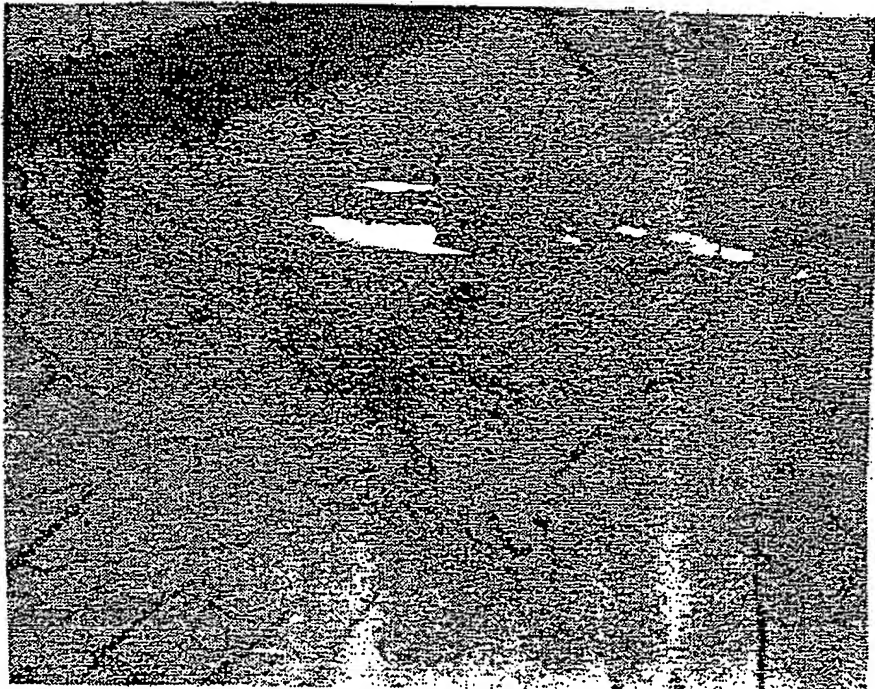
*FIG. 20A*



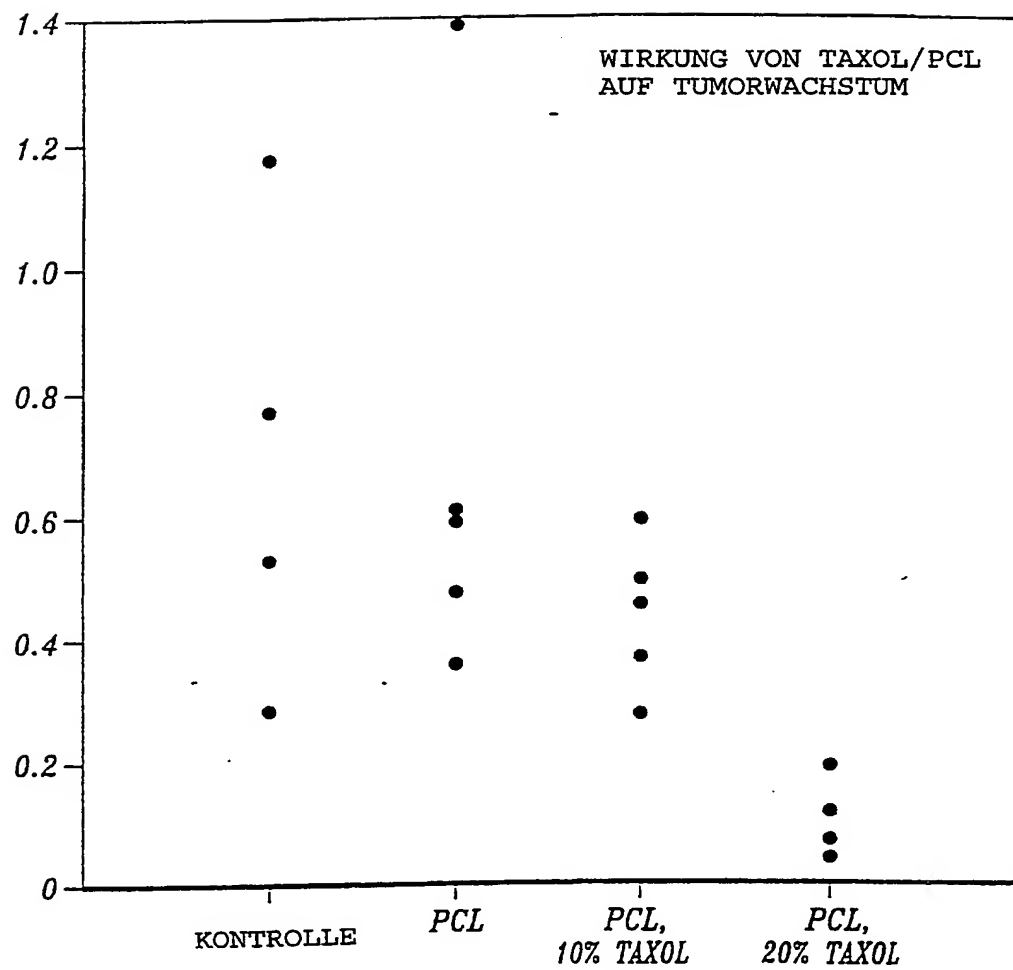
*FIG. 20B*



*FIG. 20C*



*FIG. 20D*

*FIG. 21A.*



KONTROLLE



20 % TAXOL-PASTE

QUERSCHNITTE VON TUMOREN

FIG. 21B



20 % TAXOL-PASTE



10 % TAXOL-PASTE

QUERSCHNITTE VON TUMOREN

FIG. 21C



FIG. 22A

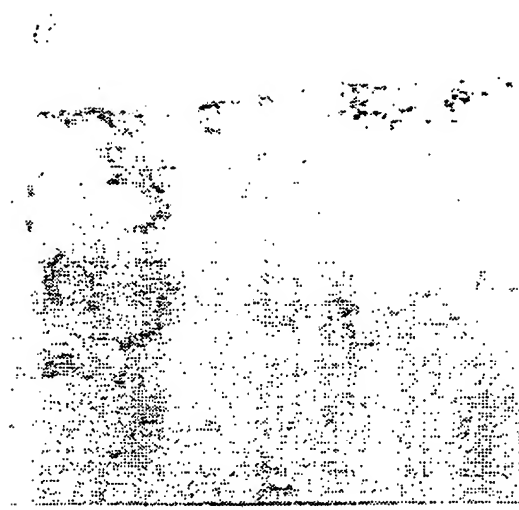


FIG. 22B

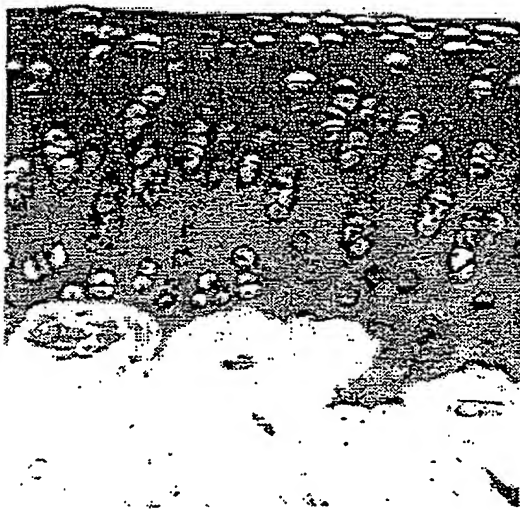


FIG. 22C

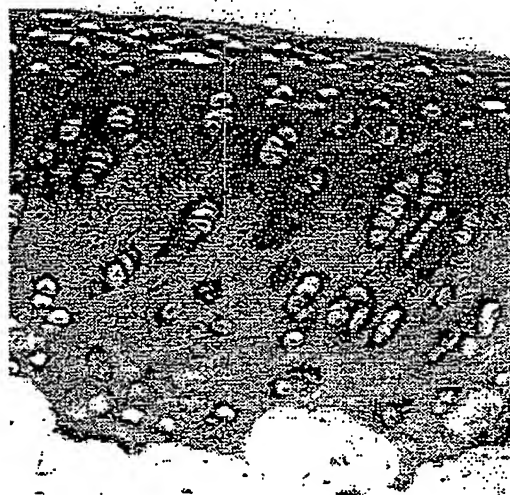


FIG. 22D



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**